J. Soc. Cosmet. Sci. Korea
Vol. 45, No. 2, June 2019, 209-216

pISSN 1226-2587
eISSN 2288-9507
http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2019.45.2.209

흰무늬엉겅퀴 열매 추출물의 자외선에 대한 피부 보호 효과

김 대 현† · 배 우 리 · 김 윤 선 · 신 동 원 · 박 선 규 · 강 내 규

LG생활건강 기술연구원
(2019년 3월 13일 접수, 2019년 6월 13일 수정, 2019년 6월 14일 채택)

Photoprotective Effects of *Silybum marianum* Extract

Daehyun Kim†, Woo Ri Bae, Yun-Sun Kim, Dong-won Shin, Sun-Gyoo Park, and Nae-Gyu Kang

LG Science Park, LG Household & Healthcare Ltd., 70, Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul 07795, Korea
(Received March 13, 2019; Revised June 13, 2019; Accepted June 14, 2019)

요 약: 자외선은 피부 광노화를 일으키며 홍반, 일광 화상 등 피부 광손상의 원인이 된다. 실리마린은 밀크씨슬로도 알려져 있는 흰무늬엉겅퀴(*Silybum marianum*; *S. m*) 추출물에 존재하는 폴리페놀 화합물로 항산화 효과 및 자외선에 대한 피부 보호 효과가 알려져 있다. 본 연구에서는 피부의 표피층에서 실리마린을 함유하는 *S. m* 추출물의 광보호 효과를 이해하고자 하였다. 표피층을 구성하는 세포들이 자외선에 노출되면 DNA 손상이 발생하는데 *S. m* 추출물이 DNA repair를 촉진할 뿐만 아니라 UV filter로 작용하여 DNA 손상을 방지하는 것도 확인할 수 있었다. 특히, 홍반이 발생하지 않는 suberythemal dose (SED)의 자외선 노출에도 각질 산화와 DNA 손상이 일어날 수 있으며, *S. m* 추출물이 이런 미세 손상이 발생하는 것을 억제하는 것도 확인하였다. 또한 자외선에 의하여 각질이 산화되어 카르보닐화 단백질(protein carbonylation)이 증가하는 현상도 *S. m* 추출물을 도포한 경우는 억제됨을 확인하였다. *S. m* 추출물은 흡광의 성질이 있지만 광독성 유발 가능성은 낮은 것으로 평가되었다. 따라서 *S. m* 추출물은 광노화를 방지하고 피부를 보호하는데 활용 될 수 있을 것이다.

Abstract: Ultraviolet rays (UV) cause photoaging by inducing skin photodamages such as erythema and sunburn. Silymarin is a mixture of antioxidant polyphenols extracted from *Silybum marianum* fruit (*S. m*), which is known as milk thistle. It is known to protect skin tissues from UV treatment and antioxidant effects. In this study, we aimed to identify the photoprotective effects of *S. m* extract, which has silymarin in the epidermis layer of the skin. We found that the extract can function as a UV filter, so it can reduce DNA damage by UV treatment. Especially, we found that, in the stratum corneum, the extract can suppress the protein carbonylarion and DNA damages caused by suberythemal dose of UV treatment which does not induce erythema in the skin. UV treatment also increased protein carbonylation levels in the stratum corneum by oxidation, but it was prevented by applying the extract. The extract can absorb UV with minimal phototoxicity. Together, our study suggests that *S. m* extract can be used as a photo-protective ingredient to avoid photoaging of the skin.

Keywords: *Silybum marianum extract, photoprotection, DNA damage, protein carbonylation*

† 주 저자 (e-mail: daehyun@lghnh.com)
call: 02-6980-1758

1. 서 론

피부는 외부 환경에 노출되어 있어 상대적으로 자외선에 대한 노출 빈도가 심하기 때문에 자외선에 의한 피부 손상을 항상 고려해야 한다. 자외선에 의한 피부 손상으로는 일반적으로 광노화, 홍반, 일광 화상 등이 있으며 심한 경우 피부암까지 이어질 수 있다[1]. UVC (200 ~ 280 nm), UVB (280 ~ 320 nm) 및 UVA (320 ~ 400 nm) 파장으로 나누어진다. UVC는 오존층에 의해 대부분 흡수되고, 지표에 도달하는 자외선은 UVA (90 ~ 95%) 및 UVB (5 ~ 10%)이다[2]. UVA는 산화 스트레스를 유발해 간접적으로 DNA를 손상시키거나 진피와 각질 단백질을 산화시킬 수 있다[3]. 산화 스트레스에 의해 카르보닐화 단백질이 증가하면 피부의 탄력을 저해할 수 있으며, 각질 단백질의 카르보닐화는 보습력을 저해하고 피부 톤을 변화시킬 수 있다[4-7]. UVB는 DNA에 직접 흡수되어 cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs)와 6-4 photoproducts와 같은 photoproducts를 형성해 DNA 손상을 일으킨다[8]. 자외선에 의한 DNA 손상이 너무 크면 세포 사멸(apoptosis)이 일어나 선번 세포(sunburn cell)가 생기고 홍반 증상이 나타나게 된다[9,10].

홍반이 발생하지 않는 자외선량(suberythemal dose, SED)은 피부에 영향이 없다고 알려져 왔지만, 최근 연구 결과에 따르면, SED에 반복적으로 노출되었을 때 DNA 손상 축적과 홍반이 나타나고 표피와 진피에서 광노화된 피부의 특징이 발견된다[9]. 손상받은 DNA의 회복은 24 h 정도로 느리기 때문에 매일 SED에 노출 된다면 DNA 손상이 축적될 수 있다. 이러한 최근 연구 결과들을 토대로 SED의 반복 노출에 대한 피부 손상을 인지하고, 실외 스포츠와 같은 야외 활동을 하지 않더라도 일상 생활에서의 피부 광손상 예방과 회복에 대한 관심도가 높아지고 있다. 이에 따라 자외선 차단이나 광보호를 위한 항산화 특성을 갖는 식물 추출물들에 대한 연구가 진행되고 있다[11].

흰무늬엉겅퀴(*Silybum marianum*; *S. m*)는 밀크 씨슬(milk thistle)이라는 이름으로도 알려져 있는 국화과 식물이다. *S. m* 추출물은 전통적으로 간염이나 알코올성 간 질환 등의 다양한 간 질환에 효과가 있다고 알려져 있어서 수 세기 동안 전통 의학에서 사용되어 왔다[12]. 실리마린(silymarin)은 silybin, isosilybin, silycristin 그리고 silydianin 등을 포함 폴리페놀 화합물로 항암 효능이 있다고 보고된 성분이다[13,14]. 실리마린의 광보호 효과에 대한 다양한 연구들도 진행되어 왔다. 실리마린은 인간 각질형성세포에 자외선을 조사하였을 때 NF-κB의 활성 증가를 억제하고 세포 사멸을 방지하며 DNA repair를 증가시킨다[15,16]. 쥐의 피부에 실리마린을 국소 도포했을 때 UVB에 의한 피부암 발생에 대한 보호 효과도 있었다[17,18]. 그밖에도 실리마린은 자외선에 의한 산화 스트레스, 염증 및 면역 반응을 억제하여 자외선에 의한 피부암 발생을 억제할 수 있다는 연구 결과도 보고되었다[19,20].

본 연구에서는 실리마린이 포함되어있는 *S. m* 추출물이 자외선에 의한 DNA 손상을 방지하고 회복에 도움이 되는지 Micropig® skin 모델과 *in vitro* 세포 실험을 통해 확인해 보았다. 또한 피부 최외각에 존재하는 각질의 산화를 방지할 수 있는지도 비침습적 방법을 통해 연구하였다. 그 결과, 홍반을 일으킬 수 있는 minimal erythermal dose (MED)의 자외선만이 아닌 예방을 소홀히 할 수 있는 SED 자외선에서도 *S. m* 추출물이 피부 손상을 억제 할 수 있음을 알 수 있었다.

2. 실험방법

2.1. 기기 및 시약

본 실험에 사용된 *Silybum marianum* (*S. m*) 추출물은 Indena (Italy)사가 *Silybum marianum*의 열매에서 추출한 추출물이고, 실리마린이 50 ~ 60% 함유되어 있다. *S. m* 추출물은 dipropylene glycol (DPG, 삼광켐, Korea)에 녹여 사용하였다. Titanium dioxide (TiO_2)는 UV M 170을 사용했고 케미랜드(Korea)에서 구매하였다.

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였고, penicillin-streptomycin, fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS) buffer 및 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Gibco (USA)에서 구입하였다.

2.2. *in Vitro* 세포 모델에서 자외선 노출

사람의 각질형성세포주인 HaCaT 세포를 10% FBS, penicillin 50 U/mL, streptomycin 50 μg/mL를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37 ℃, CO_2 세포 배양기에서 배양하였다. HaCaT을 24 well black clear-bottom plate (PerkinElmer Inc, USA)에 키운 후 배지를 제거하고 PBS 300 μL를 넣은 상태로 BIO-SUN 자외선 조사기(Vilber Lourmat, France)로 312 nm narrow-band UVB를 21 mJ/cm^2

세기로 조사하였다. UVB 조사 직후에 PBS를 FBS를 포함하는 배지로 교체하였고 24 h 후에 DNA 손상 정도를 측정하였다. *S. m* 추출물을 처리하는 경우에는 UVB를 조사하기 전 24 h 동안 *S. m* 추출물을 serum free 배지에 녹여서 처리하고, UVB 조사 직후에 다시 *S. m* 추출물을 24 h 처리하였다.

2.3. Micropig® skin 모델에서 자외선 노출

400 μm 두께의 Micropig® skin (메디키네틱스, Korea)에 BIO-SUN 자외선 조사기로 narrow-band UVB를 조사하거나 XPS 200 Xenon Lamp Power Supply (Solar Light Company, USA)로 broad-band UV를 조사하였다. *S. m* 추출물 또는 TiO_2는 자외선 조사하기 30 min 전에 2 μL/cm^{2}로 도포하고 차광하여 실온에 보관하였다.

2.4. DNA 추출 및 CPDs 측정

광손상 정도를 평가하기 위하여 HaCaT 세포 또는 Micropig® skin에서 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Netherlands)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 4 μg/mL의 DNA 시료를 OxiSelect™ UV-Induced DNA Damage ELISA Kit (Cell Biolabs, USA)에서 반응시키고 흡광도를 Epoch (BioTek Instruments, USA)로 측정하여 CPDs 양을 정량하였다. DNA repair가 반영된 결과를 평가하기 위해 자외선 조사 후 24 h 후에 CPDs를 측정하였다.

2.5. *S. m* 추출물의 광독성 평가

광독성 평가는 화장품의 동물 대체 시험법 국외 가이드라인을 따르며 *in vitro* 3T3 NRU 광독성 시험법(OECD TG 432)으로 평가하였다. 쥐의 섬유아세포 세포주인 3T3을 두 개의 플레이트에 배양 후 시험 물질을 45 min 처리하였다. 한 플레이트에는 Bio link BLX-365(Vilber Lourmat, France)로 5 J/cm^2 UVA를 조사하고(+Irr) 다른 플레이트는 UVA를 조사하지 않았다(-Irr). 시험 물질이 없는 배지로 바꿔 18 ~ 22 h 추가 배양 후 Neutral red (Sigma-Alrich, USA)를 이용하여 세포 생존도를 평가하고 IC_{50}를 구하였다. UVA를 조사하지 않은 시험 물질의 IC_{50}를 UVA 조사한 시험 물질의 IC_{50}로 나누어 photo irritation factor (PIF)를 구하였다.

2.6. 각질의 카르보닐화 단백질 측정

자외선의 산화 스트레스가 의한 각질에 미치는 영향 연구는 IRB 심의 후 피험자 동의를 얻어 수행되었다 (LG-WRNK-2018-0411). 셀로판 테이프(3M)로 각질을 떼어낸 후 fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC) (Sigma-Aldrich, USA)을 이용하여 각질 단백질 카르보닐화 정도를 평가하였다. 0.1 M 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) 버퍼에 FTSC를 20 μm로 희석한 용액에 각질 테이프를 1 h 동안 반응시켰다. 이후 염색된 테이프를 PBS 로 3회 씻어준 뒤 차광하여 건조시키고 EVOS cell imaging system (Thermo Fisher Scientific®, USA) 로 375 nm 파장에서 형광 시그널을 측정하였다.

2.7. 통계 분석

본 연구의 실험은 두 번 이상 수행하였으며, 이때 결과값들은 mean ± standard deviation (SD)으로 나타내었다. 실험군에 따른 데이터 사이의 통계적 유의성 검정은 two-tailed Student’s t-test를 통하여 검증하였고, p 값이 0.05 이하일 경우 통계학적으로 유의미한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. *S. m* 추출물의 DNA repair 촉진

자외선은 DNA 손상을 유발하고, 손상된 DNA가 누적되면 광노화나 홍반 같은 피부 손상을 일으키므로[8,9], DNA 손상을 예방하고 회복을 촉진시키는 것이 중요하다. 각질 형성세포인 HaCaT에 312 nm의 UVB를 처리한 24 h 후 가해진 자외선의 양이 증가함에 따라 CPDs 생성이 증가하였다(Figure 1A). *S. m* 추출물을 처리한 경우 UVB에 의한 CPDs 양의 증가폭이 감소하였다(Figure 1C). 이를 통하여 *S. m* 추출물이 UVB에 의한 광손상을 방지한다는 결론을 내릴 수 있다. 이 때 *S. m* 추출물은 HaCaT 세포에서 세포 독성을 일으키지 않았다(Figure 1B). Katiyar 연구팀은 실리마린을 NHEK 세포에 처리한 후 15 mJ/cm^2 UVB를 노출한 경우, 자외선 노출 직후에는 실리마린에 의한 CPDs 생성 억제 효과가 없었지만 36 h 후에는 실리마린에 의한 CPDs 생성 억제 효과가 있어, 실리마린이 UV filter로 작용하기 보다는 DNA repair에 관여할 것이라고 설명하였다[20]. 본 연구에서도 UVB 노출 24 h 후에 CPDs를 분석하였을 때 *S. m* 추출물 처리군에서 CPDs 생성이 감소하였으므로 *S. m* 추출물이 실리마린과 마찬가지로 DNA repair에 기여했다고 여겨진다.

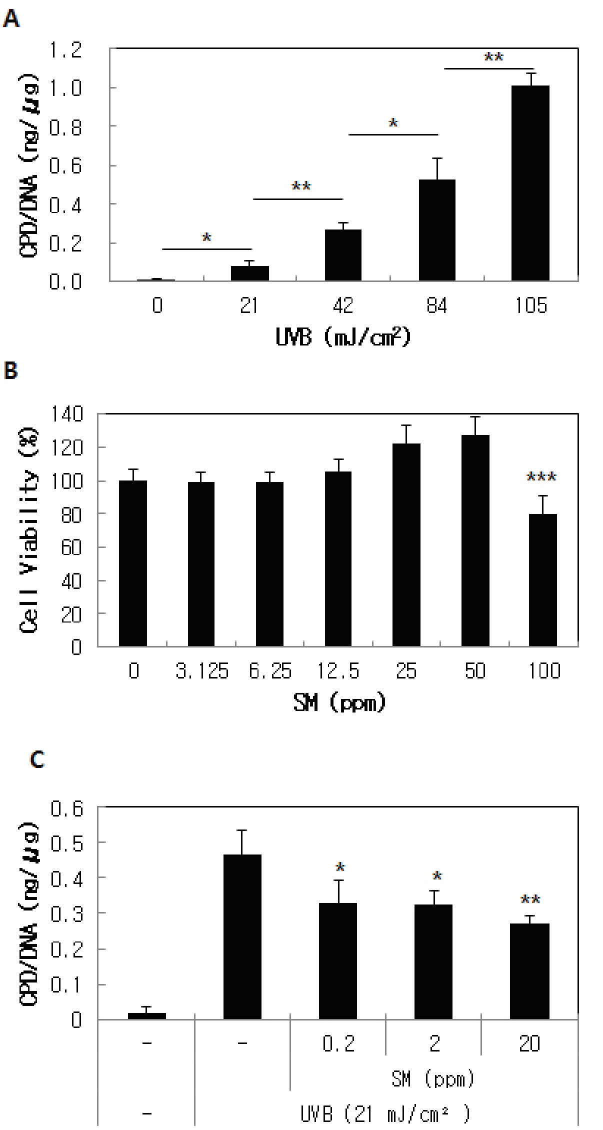

Figure 1. S. m extract increases DNA repair activity. (A) CPD generation by different doses of UVB was measured in HaCaT cells. Narrow band of (312 nm) UVB was irradiated as indicated doses. (B) Cytotoxic effect of *S. m* extract was tested by MTT assay. (C) *S. m* extract inhibited UVB-induced CPDs generation. ($^{*}p$ < 0.05, $^{**}p$ < 0.01, $^{***}p$ < 0.001)

3.2. *S. m* 추출물의 자외선 흡수에 의한 DNA 손상 방지

실리마린은 폴리페놀 화합물로 자외선을 흡광에 적합한 구조를 가지고 있다[20]. 본 연구에서 사용한 *S. m* 추출물은 실리마린을 50 ~ 60% 함유하고 있기 때문에 흡광의 특성이 있는지 확인해 보았다. UVA (315 ~ 400 nm)와 UVB (280 ~ 315 nm) 범위에서 *S. m* 추출물의 흡광도를 측정한 결과 UVB 범위에 속하는 290 nm에서 최대 흡광을 보이며 UVA 보다 UVB에서 더 많은 흡광을 나타내었다 (Figure 2). 이는 기존에 알려진 실리마린의 흡광도와 다른 패턴인데, 이미 보고된 흰무늬엉겅퀴 열매 추출물의 흡광도 패턴과 일치한다[21]. *S. m* 추출물이 UVB 영역에서 흡

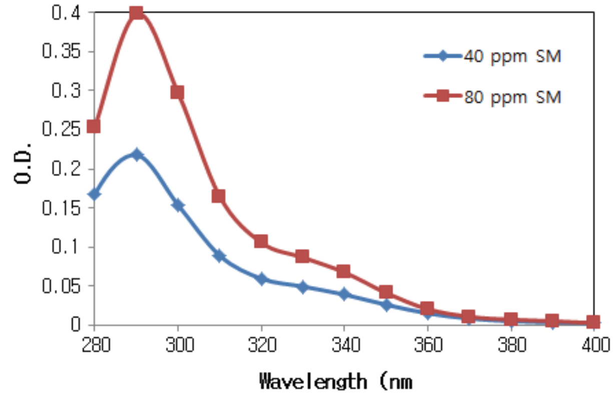

Figure 2. UV absorbing property of *S. m* extract.

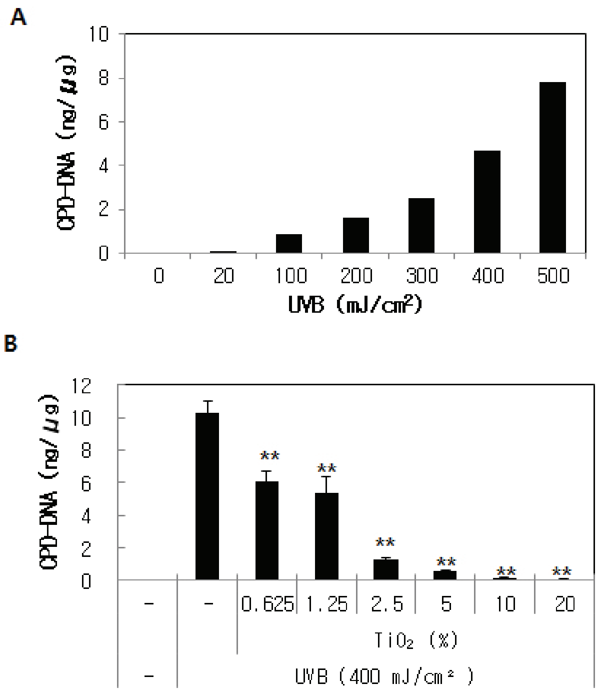

Figure 3. Experimental model for evaluate UV filter activity. (A) The amount of CPDs was measured right after irradiation with narrow-band (312 nm) UVB on Micropig® skin. (B) 30 mins after treatment of TiO_2, Micropig® skin was irradiated with UVB. ($^{**}p$ < 0.005).

광하는 성질이 있어 UV filter로도 작용할 가능성을 배제할 수 없다. Micropig® skin은 사람의 피부와 유사하면서도 죽은 조직이기 때문에 DNA repair 기전이 작동하지 않아 자외선의 직접적인 DNA 손상 정도와 UV filter의 효능을 확인할 수 있을 것으로 여겨졌다[22,23]. 이를 검증하기 위하여 Micropig® skin에 UVB를 노출하였더니 세기에 따라 CPDs 양이 증가하였다(Figure 3A). 그리고 무기 UV filter인 TiO_2를 Micropig® skin에 발라주면 UVB에 의한 CPDs 생성이 억제되었다(Figure 3B). 따라서, Micropig® skin은 TiO_2와 같은 UV filter의 반사 또는 흡광 메커니즘에 의한 DNA 보호 효과를 확인하는 데 활용될 수 있을 것이다.

Micropig® skin을 이용하여 *S. m* 추출물의 UV filter로서의 가능성을 확인해 보았다. *S. m* 추출물이 290 nm에서 최대 흡광을 나타내어, 312 nm의 UVB를 조사하는 대신 broad-band UV를 조사하였다. 홍반을 일으킬 수 있는 1 MED의 자외선을 노출 한 경우, 1000 ~ 5000 ppm의 *S. m* 추출물이 용량 의존적으로 CPDs 생성을 억제하였다(Figure 4A). SED에 해당하는 0.5 MED에 노출된 경우에도 Micropig® skin에 CPDs가 생성되었다. 이 경우에는 이 10 ~ 1000 ppm의 *S. m* 추출물이 CPDs 생성을 억제할 수 있었다(Figure 4B).

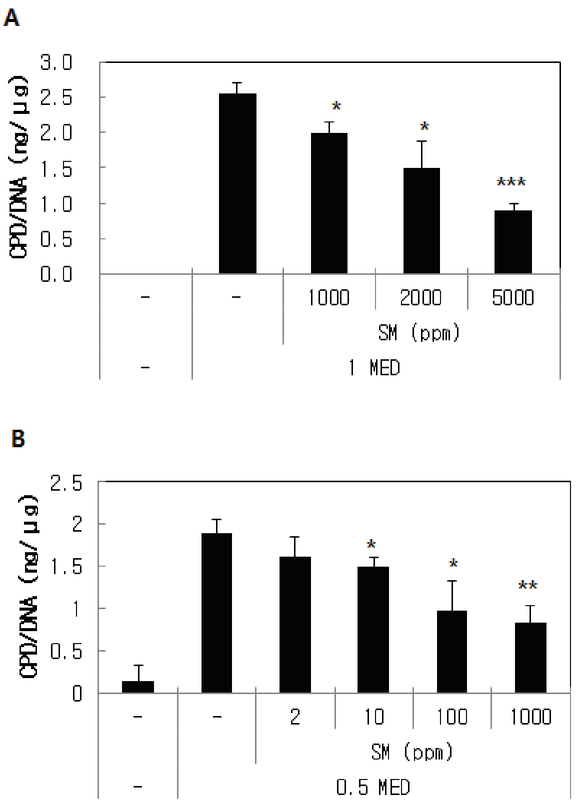

Figure 4. UV filter activity of *S. m* extract. (A, B) Micropig® skin was irradiated with broad-band UVA and UVB at indicated doses. Before irradiation, *S. m* extract was applied on Micropig® skin for 30 mins ($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.005$, $^{***}p < 0.001$ compared to the irradiated control)

자외선 영역의 빛을 흡수할 수 있는 물질은 빛과 상호작용하여 광화학반응을 일으켜 광독성을 일으킬 가능성이 있으므로[24,25], *S. m* 추출물에 대해 동물실험대체법인 *in vitro* 3T3 NRU 광독성시험을 통해 광독성을 유발 가능성을 확인해 보았다. 광독성 시험 결과는 photo irritation factor (PIF)값으로 판단하는데, PIF가 2 이상이면 광독성유발 가능성이 있다고 판단한다. 시험 결과, *S. m* 추출물은 PIF가 1.58로 광독성 유발 가능성이 낮음을 확인하였다(Table 1).

Table 1. Phototoxicity Test of *S. m* Extract

Substance	IC50 (+Irr)	IC50 (-Irr)	PIF
S. m extract	0.0124	0.0196	1.5791
Chloropromazine (Positive control)	0.9407	36.7618	39.0806

PIF= IC_{50}(-irr)/IC_{50}(+irr)

3.3. *S. m* 추출물의 각질 산화 방지

자외선과 같은 산화스트레스는 각질과 진피 단백질의 카르보닐화를 증가시킨다[3,4]. 인체 피부의 카르보닐화 단백질을 측정해본 결과 자외선 노출이 적은 상박 안쪽보다 안면부에서 카르보닐화 단백질이 많이 측정되었다(Figure 5A). 안면부를 이마, 광대, 턱 부위로 나누어 카르보닐화를 비교한 결과, 광대 부위의 각질에서 카르보닐화 단백질의 증가를 확인하였다(Figure 5B). 홍반이나 태닝의 증상이 나타나지 않아 광손상을 인지하고 있지 않은 피험자의 각질 샘플에서도 자외선 노출이 많은 부위의 피부에서 카르보닐화 단백질이 증가되어 있었다. 각질을 셀로판테이프로 분리하여 자외선을 노출 시킨 경우에도 카르보닐화 단백질은 자외선에 비례하여 증가하였다(Figure 5C). *S. m* 추출물의 항산화 효능에 의하여 단백질 카르보닐화를 방지할 수 있는지 확인해 보았다. *S. m* 추출물이 도포된 피부의 각질에서는 대조군에 비해 단백질의 카르보닐화가 적게 관찰되었다. 1 MED 자외선 조사에 의해 발생한 카르보닐화 단백질은 100 ppm의 *S. m* 추출물 선도포에 의해 육안

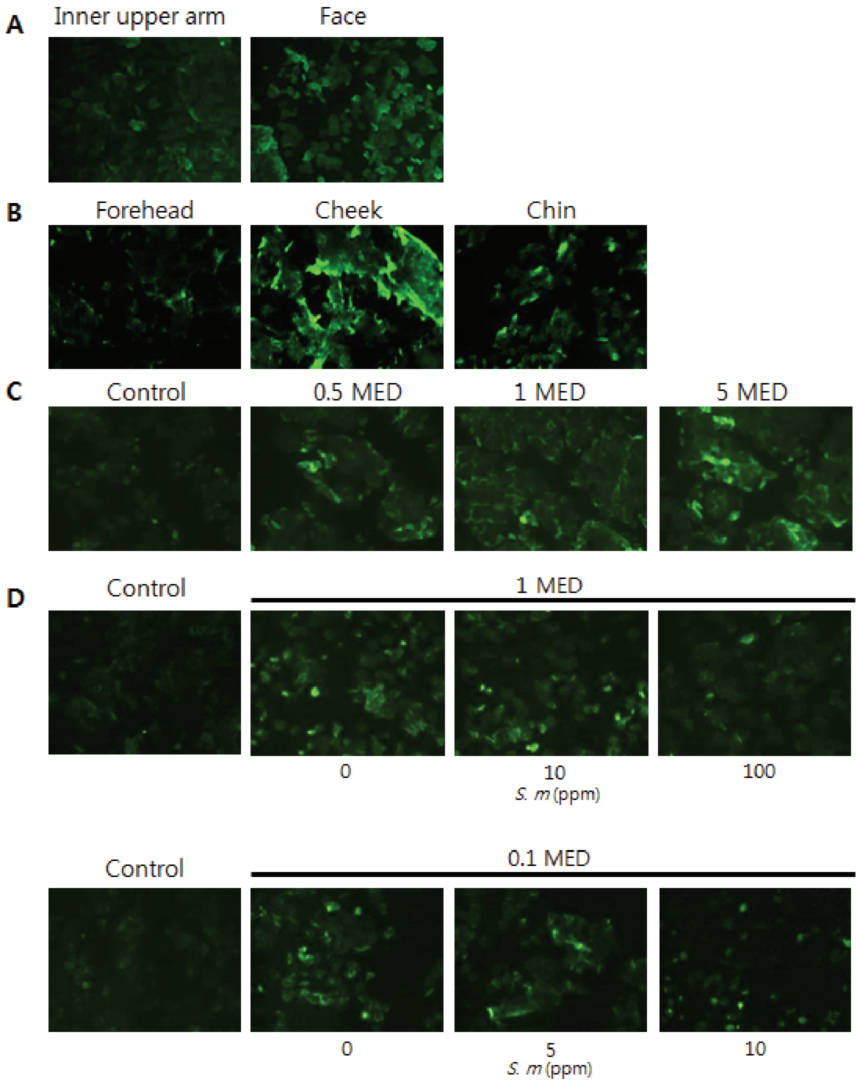

Figure 5. Protein carbonylation of Stratum corneum (A) Increase of protein carbonylation levels by sunlight at different skins. (B) Protein carbonylation at different places of face. (C) Increase of protein carbonylation at stratum corneum by UV. (D) Decrease of protein carbonylation at stratum corneum by *S. m* extract.

비교가 가능할 정도로 경감되었다. 0.1 MED의 자외선이 조사된 각질에서도 카르보닐화 단백질이 증가하였으나, 10 ppm의 *S. m* 추출물 선도포로 각질 내 단백질의 카르보닐화가 억제되었다(Figure 5D).

4. 결 론

S. m 추출물은 항산화 기능의 폴리페놀 화합물인 실리마린을 주성분으로 하여, 자외선에 의해 손상 받은 DNA의 repair를 촉진하는 기능이 있었다. 뿐만 아니라, 실리마린과 마찬가지로 폴리페놀성분의 흡광 능력을 통해 UV filter로도 작용할 수 있다는 것을 밝혔다. 과거에 발표된 *in vitro* 세포 연구에서는 UV filter의 기능보다 DNA repair 기능이 주로 연구되었다. DNA repair 기전이 배제된 DNA 손상 방지 평가모델을 고안하여 본 연구에서는 *S. m* 추출물이 UV filter로도 작용함을 설명할 수 있었다. 또한 물론 UV filter로의 기능이 현재 자외선 차단제로 사용되고 있는 유·무기 UV filter 보다는 경쟁력이 약할 수 있다. 하지만 *S. m*

추출물은 항산화 기능과 UV filter 기능을 모두 가지고 있어 자외선에 대한 피부 보호 성분으로 활용될 가치가 크다고 여겨진다. 최근에는 자외선이 피부에 미치는 유해성에 대한 인식이 증가하면서 자외선 차단제 사용에 대한 관심이 많아졌지만, 백탁 현상과 같이 사용시 발생하는 현상에 의해 권장량보다 적게 도포하는 경우가 많고 실외 스포츠 같은 특별한 야외 활동이 없다면 평소에는 사용하지 않는 경우도 많다[26]. 하지만 홍반을 일으키지 않는 약한 자외선은 눈에 보이는 홍반을 만들지는 않지만 DNA 손상과 산화 스트레스를 일으키며, 약한 자외선에 반복적으로 노출되면 피부 손상이 누적되어 홍반과 색소 침착을 유발하고 광노화를 일으킬 수 있다[9]. 또한 자외선으로부터 피부를 보호할 수 있는 안전하고 효과적인 성분에 대한 관심도 증가하고 있다[11]. *S. m* 추출물은 실리마린과 마찬가지로 자외선에 대해 피부 보호 효과가 있으므로 여러 타입의 스킨케어 제품에서 피부를 자외선으로부터 보호하는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

Reference

1. Y. Matsumura and H. N. Ananthaswamy, Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **195**(3), 298 (2004).
2. J. D'Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, and T. Scott, UV radiation and the skin, *Int J Mol Sci*, **14**(6), 12222 (2013).
3. C. S. Sander, H. Chang, S. Salzmann, C. S. L. Muller, S. Ekanayake-Mudiyanselage, P. Elsner, and J. J. Thiele, Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **118**(4), 618 (2002).
4. J. J. Thiele, S. N. Hsieh, K. Briviba, and H. Sies, Protein oxidation in human stratum corneum: susceptibility of keratins to oxidation *in vitro* and presence of a keratin oxidation gradient *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **113**(3), 335 (1999).
5. Y. Kobayashi, I. Iwai, N. Akutsu, and T. Hirao, Increased carbonyl protein levels in the stratum corneum of the face during winter, *Int J Cosmet Sci*, **30**(1), 35 (2008).
6. S. Sasaki, J. Watanabe, H. Ohtaki, S. Shioda, and H. Sueki, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine sweat secretion. *J. Dermatol. Sci.*, **84**(1), e133 (2016).
7. Y. Ogura, T. Kuwahara, M. Akiyama, S. Tajima, K. Hattori, K. Okamoto, S. Okawa, Y. Yamada, H. Tagami, M. Takahashi, and T. Hirao, Dermal carbonyl modification is related to the yellowish color change of photo-aged Japanese facial skin, *J. Dermatol. Sci.*, **64**(1), 45 (2011).
8. A. Svobodová, J. Psotová, and D. Walterová, Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, **147**(2), 137 (2003).
9. S. Seite, A. Fourtanier, D. Moyal, and A. R. Young, Photodamage to human skin by suberythemal exposure to solar ultraviolet radiation can be attenuated by sunscreens: a review, *Br. J. Dermatol.*, **163**(5), 903 (2010).
10. A. R. Young, C. A. Chadwick, G. I. Harrison, J. L. Hawk, O. Nikaido, and C. S. Potten, The *in situ* repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II, *J. Invest. Dermatol.*, **106**(6), 1307 (1996).
11. M. Radice, S. Manfredini, P. Ziosi, V. Dissette, P. Buso, A. Fallacara, and S. Vertuani, Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review, *Fitoterapia*, **114**, 144 (2016).
12. P. R. Davis-Searles, Y. Nakanishi, N. Kim, T. N. Graf, N. H. Oberlies, M. C. Wani, M. E. Wall, R. Agarwal, and D. J. Kroll, Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells, *Cancer Res.*, **65**(10), 4448 (2005).
13. K. Flora, M. Hahn, H. Rosen, and K. Benner, Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease, *Am. J. Gastroenterol.*, **93**(2), 139 (1998).
14. H. Greenlee, K. Abascal, E. Yarnell, and E. Ladas, Clinical applications of *Silybum marianum* in oncology, *Integr Cancer Ther*, **6**(2), 158 (2007).

15. C. Saliou, M. Kitazawa, L. McLaughlin, J. Yang, J. K. Lodge, T. Tetsuka, K. Iwasaki, J. Cillard, T. Okamoto, and L. Packer, Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line, *Free Radic. Biol. Med.*, **26**(1-2), 174 (1999).
16. S. K. Katiyar, N. J. Korman, H. Mukhtar, and R. Agarwal, Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model, *J. Natl. Cancer Inst.*, **89**(8), 556 (1997).
17. S. K. Katiyar, Silymarin and skin cancer prevention: Anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects (Review), *Int. J. Oncol.*, **26**(1), 169 (2005).
18. C. Couteau, C. Cheignon, E. Paparis, and L. J. Coiffard, Silymarin, a molecule of interest for topical photoprotection, *Nat. Prod. Res.*, **26**(23), 2211 (2012).
19. S. K. Katiyar, S. Meleth, and S. D. Sharma, Silymarin, a flavonoid from milk thistle (*Silybum marianum* L.), inhibits UV-induced oxidative stress through targeting infiltrating $CD11b^{+}$ cells in mouse skin, *Photochem. Photobiol.*, **84**(2), 266 (2008).
20. S. K. Katiyar, S. K. Mantena, and S. M. Meeran, Silymarin protects epidermal keratinocytes from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage by nucleotide excision repair mechanism, *PLoS ONE*, **6**(6), e21410 (2011).
21. Z. M. Ayad, O. M. S. Ibrahim, and L. W. Omar, Biosynthesis and characterization of silver nano-particles by *Silybum marianum* (silymarin) fruit extract, *Adv. Anim. Vet. Sci.,* **7**(2), 123 (2019).
22. S. Debeer, J. L. Luduec, D. Kaiserlian, P. Laurent, J. Nicolas, B. Dubois, and J. Kanitakis, Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin, *Eur J Dermatol*, **23**(4), 456 (2013).
23. E. A. Hart, M. Caccamo, J. L. Harrow, S. J. Humphray, J. G. Gilbert, S. Trevanion, T. Hubbard, J. Rogers, and M. F. Rothschild, Lessons learned from the initial sequencing of the pig genome: comparative analysis of an 8 Mb region of pig chromosome 17, *Genome Biol.*, **8**(8), R168 (2007).
24. F. P. Gasparro, Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficacy, *Environ. Health Perspect.*, **108**(Supply 1), 71 (2000).
25. J. Ferguson, Photosensitivity due to drugs, *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **18**(5), 262 (2002).
26. B. L. Diffey and J. Grice, The influence of sunscreen type on photoprotection, *Br. J. Dermatol.*, **137**(1), 103 (1997).