



Original Article / 원저

Icariin의 멜라닌합성 촉진 작용

차수빈¹, 박설아², 강리아민주¹, 우원홍³, 문연자^{1*}

¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, ²원광대학교 대학원
뷰티디자인학과, ³원광대학교 한의과대학 해부학교실

Icariin promotes melanin synthesis

Su Bin Cha¹, Seol A Park², Lea Minju Kang¹, Won Hong Woo³, Yeun Ja Mun^{1*}

¹Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of
Korean Medicine, Wonkwang University,

²Department of Beauty Design Graduate School, Wonkwang University,

³Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Wonkwang
University

ABSTRACT

Objectives : This study was conducted to investigate the effects of major constituents of *Epimedium koreanum* Nakai (Icariin, epimedium A, epimedium B, and epimedium C) on melanin synthesis.

Methods : We measured melanin contents, tyrosinase activity, and expression of Rab27a in B16F10 cells cultured with *Epimedium koreanum* Nakai ethanol extract (EKN) and their major constituents. After treatment with H89 and dibutyryl cAMP, which inhibit or promote the activation of PKA, we observed changes in melanin synthesis and tyrosinase activity stimulated by EKN.

Results : Among them, EKN and icariin enhanced tyrosinase activity and melanin contents. We confirmed that EKN augmented melanin synthesis via cAMP/PKA pathway. Icariin-induced tyrosinase activity and melanin content were attenuated by PKA inhibitor H89, while melanogenic effect of icariin was further augmented by cAMP analog, dbc AMP. However, icariin did not affect the expression of small GTPase Rab27a involved in melanosome transport.

Conclusions : These results suggest that icariin promotes melanogenesis through cAMP/PKA pathway but does not affect small GTPase Rab27a.

Key words : icariin, *Epimedium koreanum* Nakai, melanin, tyrosinase, PKA, Rab27a.

I. 서론

음양곽(*Epimedium Herba*)은 매자나무과(Berberidaceae)의 다년생 초본식물로서 50종 이상이 보고되어 있으며 전통적으로 한국, 중국 및 일본에서 그 지상부를 건조하여 약용으로 사용하고 있다. 그러나 기원식물과 라틴명은 각 국에 따라 차이가 있으며, 한국은 삼지구엽초(*Epimedium koreanum*), 중국음양곽(*E. brevicornum*), 유모음양곽(*E. pubescens*), 전엽음양곽(*E. sagittatum*), 무산음양곽(*E. washanense*)이 약용으로 사용되고 있다^{1,2)}. 그 중 삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)는 유일한 국내 자생종이며 주로 경기, 강원북부지역을 중심으로 분포하고 있다.

삼지구엽초의 약리 활성으로 혈압강하, 혈당강하, 항이노 및 항바이러스 작용 등이 보고되었으며³⁻⁶⁾, 발기부전(impotence), 골다공증(osteoporosis), 면역강하(immune suppression), 심혈관질환(cardiovascular diseases) 및 암(cancer)의 치료에 이용되고 있다⁷⁻¹¹⁾. 삼지구엽초의 구성성분으로는 icariin, hyperoside, icariside II, icaritin, epimedin A-C, chlorogenic acid, syringaresinol, icariresinol, flavonoid glycosides, lignans 등이 분리되었고¹²⁻¹⁴⁾, icariin, epimedin A-C, hyperoside는 지표 성분으로 이용되고 있다¹⁵⁻¹⁹⁾.

특히 Icariin은 음양곽과 삼지구엽초의 주요 구성성분으로서 난소적출 마우스모델에서 뼈분해를 억제하고²⁰⁾, BMP2/Runx2 및 OPG/RANLKL 경로를 통해 뼈형성을 촉진하며²¹⁾, 혈관신생(angiogenesis) 작용이 보고되었다²²⁾.

멜라닌 합성에 관한 선행연구로는 멜라닌세포와 마우스 모발에서 음양곽이 멜라닌 생성을 촉진하였고, 차 등은 삼지구엽초가 cAMP/PKA를 경유하여 멜라닌의 합성을 촉진한다고 보고하였다²²⁻²⁵⁾. 이에 본 연구는 삼지구엽초에서 멜라닌 합성을 촉진하는 주요

활성성분과 그 기전을 분석하기 위하여 삼지구엽초의 주요 구성성분인 icariin, epimedin A-C의 멜라닌 합성 촉진작용을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료

삼지구엽초는 국내에서 채집한 삼지구엽초를 70% 에탄올로 추출하여 동결 건조한 것으로 약용식물소재은행(한국)에서 구입하였으며, icariin은 Sigma (Saint Louis, USA), epimedin A, epimedin B, epimedin C는 ALB Technology(Henderson, USA)에서 구입하였다. 각 시료는 냉동실에 보관하였으며 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다.

2. 세포주

한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양 받은 B16F10 세포는 5% fetal bovine serum(FBS)과 100 $\mu\text{g/ml}$ penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B를 첨가한 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

3. 세포생존율 측정

세포를 24-well에 2×10⁴ 개씩 분주하여 24시간 부착하고 여러 농도의 시료에 배양하였다. 48시간 후 배양액에 MTT 용액을 5 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가하고 3시간 후 상층액을 제거하였다. 세포 내에 형성된 formazan 을 DMSO(1 ml)에 녹인 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

4. Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법으로²⁶⁾ 측정하였다. 6 cm 배양용기에 B16F10 세

*Corresponding author : Yeun Ja Mun, Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University, 460, Iksan-daero, Iksan-si, Jeollabuk-do, 54538, Republic of Korea.
Tel : +82-63-850-6942, Fax : +82-63-850-7324, E-mail : yjmun@wku.ac.kr

•Received : February 12, 2020 / Revised : February 21, 2020 / Accepted : February 26, 2020

포를 3×10^4 개씩 분주하여 부착시키고 시료를 72시간 처리하였다. 배양 후 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고, 5 mM EDTA가 포함된 0.1 M sodium phosphate buffer (SPB, pH 6.8)에 1% (V/V) triton X-100 과 0.1% (V/V) 0.1 M PMSF를 혼합한 lysis buffer를 분주하고 수거하여 얼음에서 30분간 세포를 용해시켰다. 4 °C 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상층액을 분리하여 사용하였다. Bradford 시약으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 시료의 단백질 정량을 하였으며, 동일한 양의 단백질에 0.1 M SPB (pH 6.8)를 이용하여 150 μ l이 되도록 보정하였다. 0.1 % (W/V) L-DOPA 50 μ l를 분주하고 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 멜라닌 정량 및 멜라닌 색소 관찰

멜라닌 정량은 Hosei 등의 방법²⁷⁾을 변형하여 사용하였다. 10 cm 배양용기에 1×10^5 개씩 분주하여 24시간 부착시키고 시료를 72시간 처리하였다. 각 군당 2×10^6 개의 세포를 수거하여 lysis buffer (5 mM EDTA, 0.1 M SPB, 1 % triton X-100)로 세포를 용해하였다. 원심분리하여 얻은 세포 침전물을 알코올로 세척한 후 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH 용액으로 90 °C에서 1시간 용해하여 475 nm로 흡광도를 측정하였다.

멜라닌색소를 관찰하기 위하여 시료에 5일간 배양하고 각 군당 5×10^6 세포를 수집한 후 육안으로 세포 침전물의 색 변화를 관찰하였다. 멜라닌세포 자극 호르몬 (α -MSH, 10 nM)을 처리하여 양성 대조군으로 하였다.

6. 단백질발현 측정

10 cm 배양용기에 1×10^5 세포/dish의 밀도로 분주하여 부착시키고 시료를 72시간 처리하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 lysis buffer로 4°C에서 30분간 용해시킨 후, 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 세포 용해액은 Bradford 방법을 이용하여 단백질을 정량하였다. 세포용해액은 2×sample buffer와 혼합하여 95°C에서 5분간 끓인 후 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)

에 전이시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking하였다. Rab27a 항체에 4°C에서 16시간 반응시키고, TBST로 세척한 후 HRP-conjugated secondary antibody와 1시간 반응시킨 후 WEST-ZOL[®](plus) Western blot detection system (iNtRON, Korea)을 사용하여 ChemiDoc으로 band의 사진을 촬영하였다.

7. 통계학적 분석

실험 결과는 ANOVA test를 이용하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 *, $p < 0.01$ 인 경우 **로 유의성이 있다고 표시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 삼지구엽초의 멜라닌 합성 촉진 작용

멜라닌 합성과 관련하여 이 등²³⁾은 음양곽이 멜라닌세포의 tyrosinase 활성과 마우스 모발에서 멜라닌의 생성을 촉진하며, 차 등²⁵⁾은 삼지구엽초가 cAMP/PKA를 경유하여 멜라닌 합성을 촉진함을 보고하였다. 이에 본 연구에서는 멜라닌 합성을 촉진시키는 삼지구엽초의 활성성분을 확인하기 위하여 먼저 삼지구엽초의 작용을 확인하였다. 본 실험에서 삼지구엽초 처리 시 25~100 μ g/ml 농도에서 멜라닌세포의 tyrosinase 활성이 증가하였고 (Fig. 1A), 육안적 관찰에서도 멜라닌 색소가 현저히 증가하였다 (Fig. 1B). 멜라닌 생성에 관여하는 경로는 cAMP/PKA를 비롯하여 PKC, NO와 cGMP 등 여러 가지 신호전달 경로가 보고되었으며, 그 중 cAMP/PKA는 멜라닌 합성의 주요 경로이므로 PKA 억제제 (H89)를 처리하여 삼지구엽초의 작용이 PKA를 경유하는지 확인한 결과, H89 처리 시 멜라닌세포의 색소가 감소하였으며, 특히 H89는 삼지구엽초에 의해서 증가된 멜라닌 색소를 현저하게 감소시켰다 (Fig. 1B). 또한 cyclic AMP 유도체인 dibutyryl cAMP 처리 시에도 멜라닌세포의 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성을 촉진하였고, 삼지구엽초와 병용 처리한 경우 상승 작용을 나타냈다 (Fig. 1C & D). 이는 삼지구엽초가 cAMP/PKA를 경유하여 멜라닌의 합성을 촉진한다는 보고와 일치하였다.

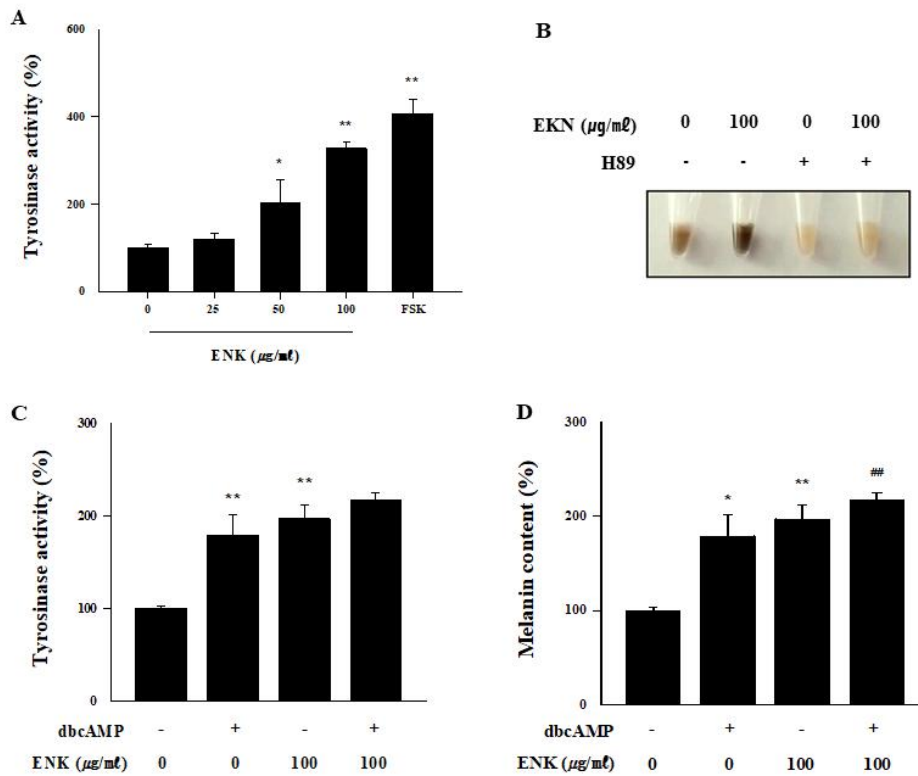


Fig. 1. EKN stimulated the tyrosinase activity through the cAMP/PKA pathway. (A) The cells were treated with EKN (25 , 50 ,100 μg/ml) and FSK 500 nM for 72 h. And tyrosinase activity was measured in B16F10 cells. (B) The cells were pretreated with 1.5 μM of PKA inhibitor H89 for 1 h and treated with 100 μg/ml of EKN. Images show the color of cell pellet. (C & D) The cells were pretreated with dbcAMP (500 μM) and treated with EKN (100 μg/ml) for 48 h. Values are means ± S.D, N=3. * p<0.05, ** p<0.01, compared to the untreated control. ## p<0.01, compared to EKN.

2. 삼지구엽초 주요 구성성분 icariin의 멜라닌 합성 촉진 효과

삼지구엽초의 주요 성분으로는 icariin을 비롯하여 hyperoside, icariside II, epimedin A, B, C 등이 있으며 icaritin이 소량 함유되어 있다^{28,29}. 따라서 본 연구에서 삼지구엽초의 주요 구성성분인 동시에 지표물질로 이용되고 있는 icariin, epimedin A, B, C가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). 각 시료의 5~20 μg/ml 농도 구간에서 멜라닌세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았으며(Fig. 3),

icariin 처리군에서 농도의존적으로 tyrosinase 활성과 멜라닌양이 증가하였다(Fig. 4). 따라서 icariin, epimedin A, B, C 중 icariin이 삼지구엽초와 동일하게 멜라닌 합성 촉진 작용을 나타냄을 알 수 있었다. 현재까지 Epimedium 속으로부터 260개의 화합물: 141개 플라보노이드, 31개 lignans, 12 ionones, 9 phenol glycosides, 6 phenylethanoid glycosides, 5 sesquiterpenes과 광범위한 이차대사 산물의 화합물들이 분리되었고²⁸, 그 중 프레닐플라보노이드 (prenylflavonoid)는 주요 활성 성분으로서 성호르몬

효과, 항산화작용, 골다공증 예방, 항우울 및 항종양 작용을 나타내고 있다. 특히 icariin은 혈행과 면역기능을 개선하며, 뼈파괴세포(osteoclast)의 작용을 억제하고, 뼈모세포(osteoblast)의 분화를 촉진하는 것

으로 보고되었다^{7-11,20)}. 따라서 본 실험결과, 삼지구엽초의 멜라닌합성 촉진 작용의 활성성분은 icariin에 의한 것을 알 수 있었다.

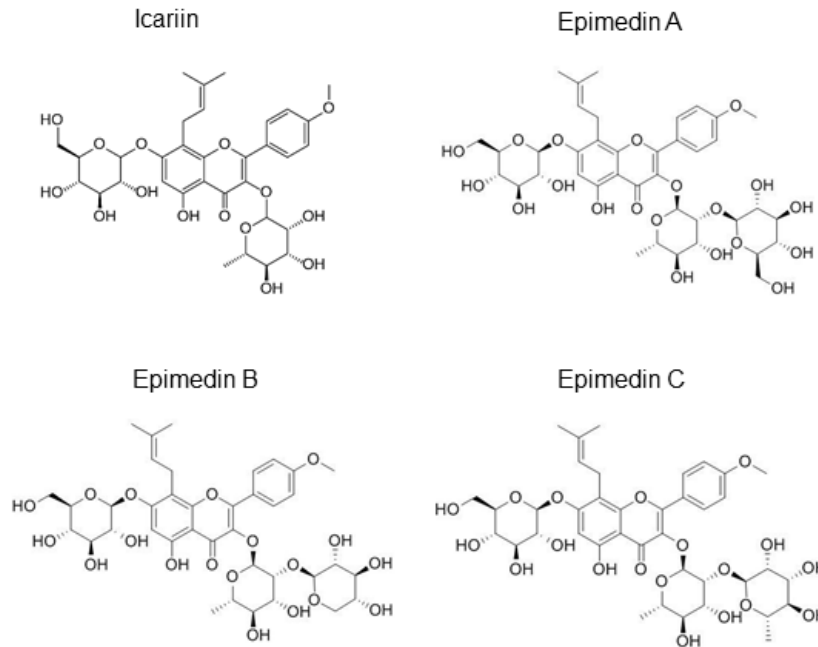


Fig. 2. Chemical structures of four prenylated flavonoids in *Epimedium Koreanum* NAKAI

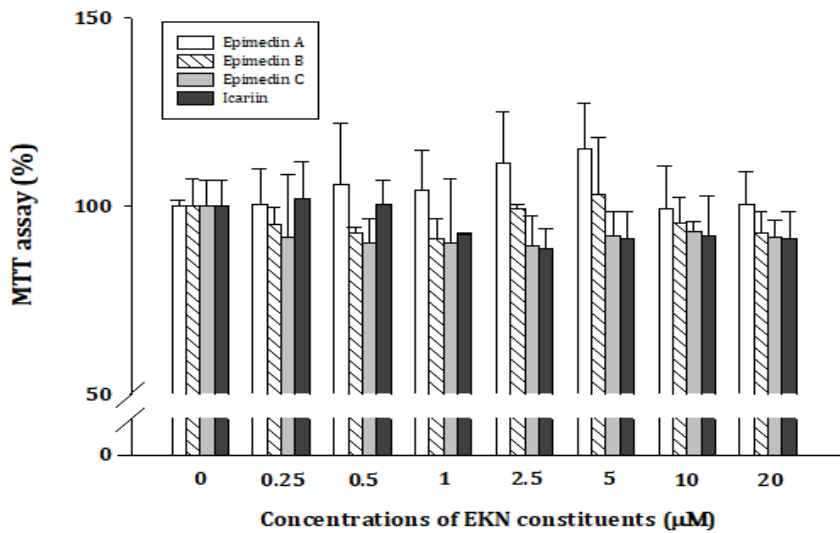


Fig. 3. Effect of EKN constituents on cell viability. The cells were treated with epimedin A, epimedin B, epimedin C, and icariin at different concentrations for 72 h. The proportion of survival cells were measured by MTT assay. Data are mean \pm S.D, N=3.

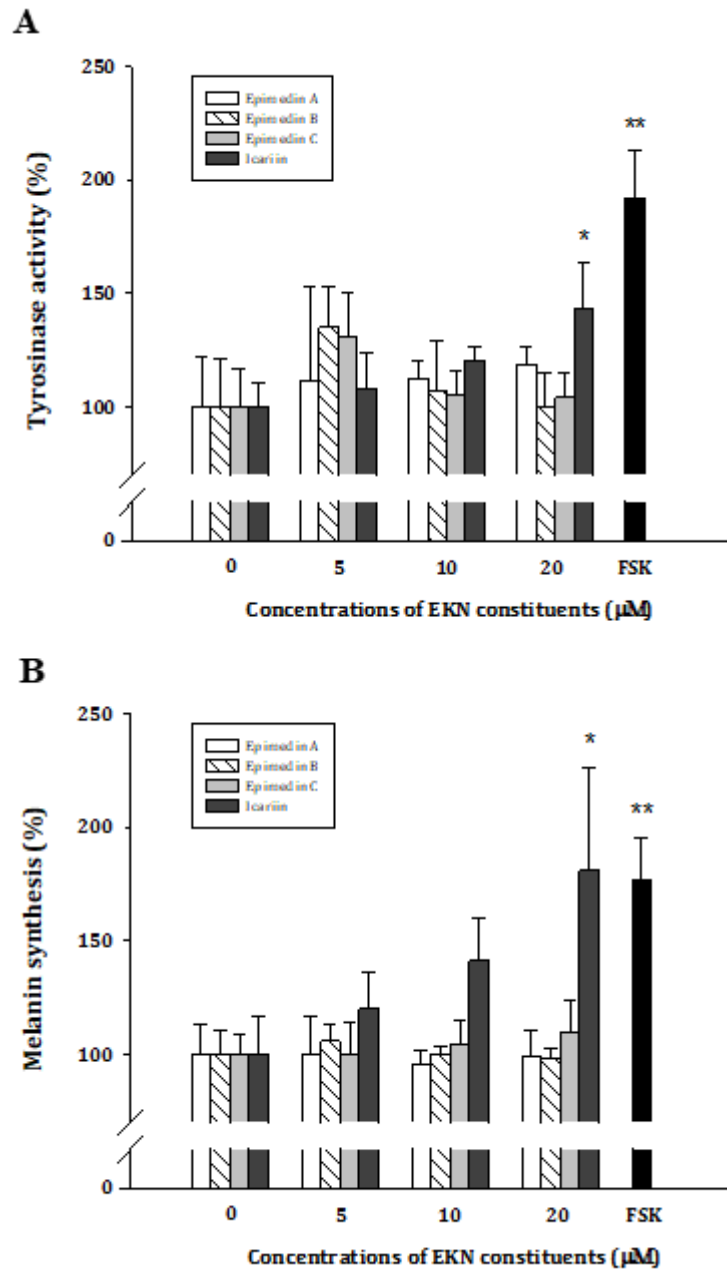


Fig. 4. Effect of EKN constituents on tyrosinase activity and melanin synthesis. The cells were treated with epimedin A, epimedin B, epimedin C, icaritin (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) and FSK 200 nM. The tyrosinase activity (A) and melanin contents (B) were determined 72 h later. Data are expressed as % of control cells. Values are means \pm S.D, N=3. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to the untreated control.

3. PKA 억제제에 의한 Icariin의 멜라닌 합성 억제

Icariin이 삼지구엽초의 멜라닌 합성 촉진작용과 동일하게 cAMP/PKA를 경유하여 멜라닌의 합성을 촉진하는지 PKA 억제제를 이용하여 확인하였다. PKA 억제제 H89는 icariin에 의해 증가된 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 감소시켰으며, H89와 icariin 병용 처리군에서는 icariin이 H89의 멜라닌 생성 억제 효과를 일부 상쇄하였다(Fig. 5). 멜라닌은

cAMP/PKA, PKC, NO/cGMP 등 여러 신호전달 경로를 통해 합성되고, 특히 PKA는 cAMP responsive element binding protein(CREB)와 microphthalmia-associated transcription factor(MITF)를 활성화하여 tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), TRP-2의 전사를 촉진한다. 따라서 본 실험 결과 icariin은 PKA를 경유하여 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 촉진하였다.

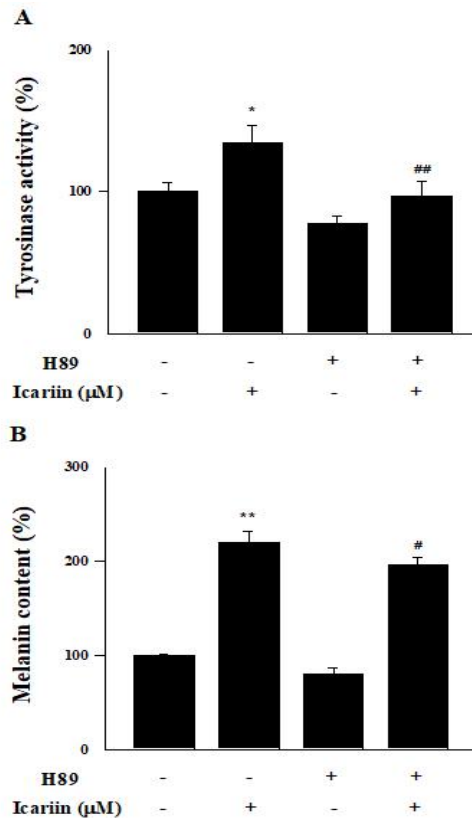


Fig. 5. PKA inhibitor suppressed icariin-induced tyrosinase activity and melanin synthesis. The cells were pretreated with 1.5 μM of H89 for 1 h and treated with 20 μM of icariin. The tyrosinase activity (A) and melanin contents (B) were determined 72 h later. Data are expressed as % of control cells. Values are means ± S.D, N=3. ** p<0.01, compared to the untreated control. # p<0.05, compared to EKN.

4. 멜라노솜 수송단백질 Rab27a에 미치는 영향

멜라닌 색소를 함유하고 있는 멜라노솜은 핵 주변 부위로부터 40여개의 각질세포(keratinocyte)와 연결되어 말초네트워드를 형성하는 수상돌기를 거쳐 각질 세포로 수송된다. 본 연구에서 삼지구엽초(50, 100 μg/ml)와 icariin(5~20 μM/μg/ml)이 저분자량 G단백

질 Rab27a에 미치는 영향을 조사한 결과 멜라닌세포의 Rab27a 단백질 발현에 변화가 없었다(Fig. 6). MyoVa는 막결합단백질로 세포소기관의 수송에 관여하는데, 최근 저분자량 G단백질 Rab27a이 MyoVa와 melanophilin과 결합하여 멜라노솜을 핵주변으로부터 세포막까지 수송하는데 필수적인 역할을 하고 있

음이 보고되었다^{30,31)}. 이러한 과정은 사람의 피부와 모발의 색소침착에 기본적인 과정이며, Robinson 등은 Rab27a가 MyoVa보다 멜라노솜에 안정적으로 부착하고 melanophilin이 Rab27a 보다 더 빠르게 전환된다고 보고하였다³²⁾. 또한 melanophilin 과 Rab27a의 상호작용이 MyoVa의 기능을 조절하는데 주요한 인

자로 보고하였다. 따라서 본 실험에서 삼지구엽초와 icariin이 멜라노솜의 수송에 관여하는 Rab27a에 대한 영향을 조사하였으나 이들의 발현에 영향을 미치지 않았다. 그러나 MyoVa나 melanophilin 을 통해 멜라닌의 이동을 조절할 가능성도 남아 있다.

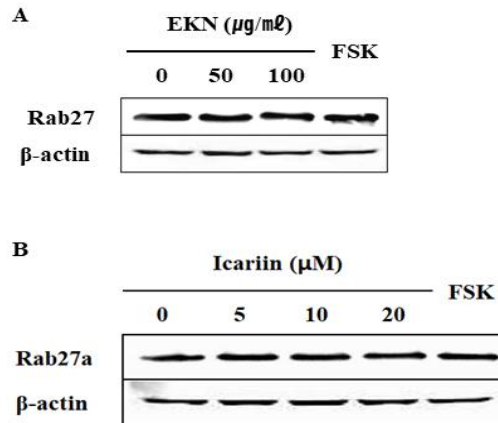


Fig. 6. Effects of EKN and icariin on expression of Rab27a protein. The cells were treated with EKN (A) or icariin (B). After 72 h, the expression of Rab27a protein was analysed using western blot as described in materials and methods. Values are means \pm S.D, N=3.

IV. 결론

본 연구는 삼지구엽초에서 멜라닌 합성을 촉진하는 주요 활성성분과 그 기전을 분석하기 위하여 삼지구엽초의 주요 구성성분인 icariin, epimedin A, B, C의 멜라닌 합성 촉진작용을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 삼지구엽초 25~100 µg/ml 농도에서 멜라닌세포의 tyrosinase 활성과 멜라닌 색소가 증가하였다. 이는 PKA 억제제에 의해 감소되었고, cyclic AMP 유도체에 의해 상승되었다.
- 삼지구엽초의 주요 구성성분인 icariin, epimedin A, B, C 중 icariin은 5~20 µg/ml 농도에서 삼지구엽초와 유사하게 멜라닌 합성을 촉진하였다.
- Icariin의 tyrosinase 활성 및 멜라닌 합성 촉진 작용은 PKA 억제제에 의해 감소되었다.
- 삼지구엽초와 icariin은 멜라노솜의 이동에 관여하는 저분자량 G단백질 Rab27a의 발현에 영향

을 미치지 않았다.

이상의 결과 icariin은 PKA를 경유하여 멜라닌의 합성을 촉진하였으며, 멜라닌 수송에 관여하는 Rab27a의 발현에는 영향을 미치지 않았다.

감사의 말씀

본 연구는 2018학년도 원광대학교 교비 지원에 의하여 수행되었습니다.

References

- Ma H, He X, Yang Y, Li M, Hao D, Jia Z. The genus Epimedium: An ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharm.* 2011;134:519-41.
- Zhao HY, Sun JH, Fan MX, Fan L, Zhou L, Li Z, Han J, Wang BR, Guo DA. Analysis of phenolic compounds in Epimedium plants using

- liquid chromatography coupled with electrosprey ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2018;1190:157–81.
3. Shin KH, Lim SS, Ahn SD, Kim SK, Park KY. Difference in components of *Epimedium koreanum* in compliance with seasons and places of collection. *Kor J Medicinal Crop Sci*. 1996;4:321–8.
 4. Kim DH, Jung HA, Sohn HS, Kim JW, Choi JS. Potential of Icaria Metabolites from *Epimedium koreanum* Nakai as Antidiabetic Therapeutic Agents. *Molecules*. 2017;22(6):E986, doi:10.3390/molecules22060986.
 5. Han YH, Choi BR, Soh HS, Lee SJ, Choi YJ, Kim SY. In vitro plant regeneration for mass propagation of *Epimedium koreanum* Nakai. *Kor J Hort Sci Technol*. 2000;18:834.
 6. Cho WK, Kim H, Choi YJ, Yim NH, Yang HJ, Ma JY. *Epimedium koreanum* Nakai water extract exhibits antiviral activity against porcine epidermic diarrhea virus in vitro and in vivo. *Evid. Based Complement. Alternat Med*. 2012;2012:985151
 7. Hang DH, Yang J, Lu XM, Deng Y, Xiong ZL, Li FM. An integrated plasma and urinary metabonomic study using UHPLC–MS: intervention effects of *Epimedium koreanum* on ‘kidney–Yang Deficiency syndrome’ rats. *J Pharm Biomed*. 2013;76:200–6.
 8. Xu FF, Ding Y, Guo YY, Liu BY, Kou ZN, Xiao W, et al. Anti–osteoporosis effect of *Epimedium* via an estrogen–like mechanism based on a system–leve approach. *J Ethnopharmacol*. 2016;177:148–60.
 9. Fan YP, Ren MM, Hou WF, Guo C, Tong DW, Ma L, et al. The activation of *Epimedium koreanum* Nakai polysaccharide– propolis flavones liposome on Kupffer cells. *Carbohydr Polym* 2015;133:613–23.
 10. Inokuchi J, Okabe H, Yamauch T, Nagamatsu A. Inhibitors of angiotensin–converting enzyme in crude drugs. *J Chem Pharm Bull*. 1984; 32:3615–9.
 11. Zhang HY, Li YJ, Yang XD, Wnag K, Ni JZ, Qu XG. Inhibitory effect of *Epimedium* extract on S–adenosyl–L–homocystein hydrolase and biomethylation. *Life Sci*. 2005;78:180–6.
 12. Keum JH, Han HY, Roh HS, Seok JH, Lee JK, Jeong J, Kim JA, Woo MH, Choi JS, Min BS. Analysis and stability test of the extracts from *Epimedium Herba*, *Atractylodis Rhizoma Alba* and *Polygalae Radix* for toxicity study. *Korean J Pharmacogn*. 2014;45: 135–40.
 13. Li WK, Xiao PG, Pan JQ. Complete assignment of 1H– and 13C–NMR spectra of ikarisoside A and epimedoside C. *Magn Reson Chem*. 1998;36:303–4.
 14. Li WK, Pan JQ, Lü MJ, Zhang RY, Xiao PG. A 9,10–dihydrophenanthrene derivate from *Epimedium koreanum*. *Phytochemistry*. 1995;39:231–3.
 15. Wang SP, Shen P, Lee L, Li Y, Yong EL. Pharmacokinetics of prenylflavonoids and correlations with the dynamics of estrogen action in sera following ingestion of a standardized *Epimedium* extract. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;50:216–23.
 16. Zhao Y, Chen S, Wang Y, Lu C, Wang J, Lu J. Effect of drying processes on prenylflavonoid content and antioxidant activity of *Epimedium koreanum* Nakai. *J Food & Drug Analysis*. 2018;26:796–806.
 17. Indran IR, Liang ZRL, Min TE, Yong EL. Preclinical studies and clinical evaluation of compounds from the genus *Epimedium* for osteoporosis and bone health. *Pharmacol Ther*. 2016;162:188–206.
 18. Gong MJ, Han B, Wang SM, Liang SW, Zou ZJ. Icaria reverses corticosterone–induced depression–like behavior, decrease in hippocampal brain–derived neurotrophic factor (BDNF) and metabolic network disturbances revealed by NMR–based metabonomics in rats. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;123:63–73.

19. Guo YM, Zang XT, Meng J, Wang ZY. An anticancer agent icariin induces sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway and inhibits growth of breast cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2011;658:114-22.
20. Mok SK, Chen WF, Lai WP, Leung PC, Wang XL, Yao XS, et al. Icariin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR 106 cells. *Br J Pharmacol.* 2010;159:939-49.
21. Zhang Y, Shen L, Mao Z, Wang N, Wang X, Huang X, Shou D, Wen C. Icariin Enhances Bone Repair in Rabbits with Bone Infection during Post-infection Treatment and Prevents Inhibition of Osteoblasts by Vancomycin. *Front Pharmacol.* 2017;8:784, doi: 10.3389/fphar.2017.00784.
22. Chung BH, Kim JD, Kim CK, Kim JH, Won MH, Lee HS, Dong MS, Ha KS, Kwon YG, Kim YM. Icariin stimulates angiogenesis by activating the MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(2):404-8.
23. Lee EJ, Bae SY, Lee YH. The Stimulatory Effects of Epimedium koreanum Nakai Extract on Melanogenesis. *J Soc Cosmet Scientists Korea.* 2009;35:265-70.
24. Ko JA, Park EY, Kim SN, Kim YC. The Effect of Epimedium koreanum Water Extract on the Enzymes and Factor Relevant to Melanin Synthesis in Vitro Test. *J Investigative Cosmetology.* 2011;7:45-52.
25. Cha SB, Kim DH, Mun YJ, Woo WH. Melanogenic Effect and the Mechanism of Epimedium koreanum Nakai. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2017;31(4):226-32.
26. Martínez-Esparza M, Jiménez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, García-Borrón JC. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem.* 1998;255:139-46.
27. Hosoi JE, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 1985;45:1474-8.
28. Chen XJ, Ji H, Zhang QW, Tu PF, Wang YT, Guo BL, Li SP. A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;46:226-35.
29. Islam NM, Yoo HH, Lee MW, Dong MS, Park YI, Jeong HS, Kim DH. Simultaneous quantitation of five flavonoid glycosides in Herba Epimedii by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal.* 2008;19:71-7.
30. Hume AN, Seabra MC. Melanosomes on the move: a model to understand organelle dynamics. *Biochem Soc Trans.* 2011;39:1191-6.
31. Kim B, Lee JY, Lee HY, Nam KY, Park J, Lee SM, Kim EJ, Lee JD, Hwang JS. Hesperidin suppresses melanosome transport by blocking the interaction of Rab27A-melanophilin. *Biomol Ther.* 2013;21:343-8.
32. Robinson CL, Evans RD, Sivarasr K, Ramalho JS, Briggs DA, Hume AN. The adaptor protein melanophilin regulates dynamic myosin-Va: cargo interaction and dendrite development in melanocytes. *Molecular Biol Cell.* 2019;30:742-52.