

생맥산가미방 추출물이 멜라닌 생합성 저해 효과와 SOD 활성화에 미치는 연구

정현우* · 최찬헌

동신대학교 한의과대학

Study of ShengmaisanJiawefang Extracts on the Inhibitory Effects of Melanin Synthesis and Superoxide Dismutase Activity

Hyun Woo Jeong*, Chan Hen Choi

College of Korean Medicine, Dongshin University

This study aims to evaluate the effects of Shengmaisan (SMS) and three types of ShengmaisanJiawefang on the inhibitory effect of melanin synthesis in B16F10 cells, the mechanism of action through tyrosinase, and the antioxidant effect through superoxide dismutase (SOD) activity. In this study, we used ShengmaisanJiawefangs (SMS, SMSRR, SMSAD, SMSAR) to research the whitening effects in B16F10 cell lines. Shengmaisan (SMS) was a herbal medicine composed of Ginseng Radix, Liriodopsis Tuber, and Schisandrae Fructus. ShengmaisanJiawefangs included SMSRR (SMS added with Rehmanniae Radix), SMSAD (SMS added with Asparagi Radix) and SMSAR (SMS added with Astragali Radix). We measured the cell viability, the inhibition rate of the melanin biosynthesis, and the activity of tyrosinase and SOD in malignant melanoma, B16F10 cells, to survey the whitening effect and the mechanism of the impact on the sample. As a result, SMSRR significantly suppressed the cell viability of B16F10 at more than 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and significantly inhibited the generation of melanin induced by $\alpha\text{-MSH}$ at more than 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. SMSRR (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) decreased the activity of tyrosinase while increased the activity of SOD. Therefore, we considered that the SMSRR would be able to produce high value-added products more SMS if used as a commercial.

keywords : Shengmaisanjiawefang, Rehmanniae Radix, Melanin synthesis, Tyrosinase, Superoxide dismutase

서론

사람의 피부색을 결정하는 작용을 하는 멜라닌¹⁾은 검은 색소와 단백질의 복합체로 피부 및 머리카락의 색깔을 결정짓는 색소 중의 하나이다²⁾. 이러한 색소 침착이 오는 원인 중의 하나는 태양광선으로부터 들어오는 자외선이다³⁾. 최근, 오존층 파괴로 피부가 자외선에 많이 노출되면서 멜라닌 세포의 멜라노솜 활성이 증가^{4,5)}됨으로써 자외선으로부터 피부의 손상을 방어하기 위한 기전으로 tyrosinase 효소 등이 활성화된다^{3,6)}.

『素問·舉痛論』에서는 여름철 暑邪로 인해 땀을 많이 흘리게 되면 氣도 같이 빠져나가게 되니⁷⁾ 여름철에 暑邪로 인한 元氣의 손상⁸⁾을 방지하기 위해 마땅히 生脈散을 물 대신 복용하라⁹⁾ 하였다.

생맥산은 최초로 『景岳全書』¹⁰⁾에 暑熱로 元氣가 상해 肢體倦怠, 氣短口渴, 汗出不止하니 陰津을 滋養할 목적으로 人蔘, 麥門冬, 五味子を 배합해 사용한다 한 이래 康¹¹⁾은 심장의 기능을 강하게 하고 津液을 보충시켜 준다고 하였다.

지금까지 발표된 생맥산 연구로는, 비만 중년여성의 신체조성 및 면역세포 변화에 미치는 영향¹²⁾이, 카누선수들의 운동수행능력과 피로물질에 미치는 영향¹³⁾이, 위장관 운동 조절에 미치는 영향¹⁴⁾이 있었고, 또한 생맥산에 감초, 길경을 가미한 가미생맥산이 항산화 및 항염에 미치는 영향¹⁵⁾과 특히 자외선 조사에 의한 피부각질세포의 상해에 미치는 회복 효과¹⁶⁾가 보고되었다.

또한, 멜라닌과 미백과 관련된 연구를 살펴보면, 매실 등의 추출물¹⁷⁾, 자소엽 조다당¹⁸⁾, 유산균으로 발효된 보리 씨앗¹⁹⁾, 청상방풍²⁰⁾ 등을 이용한 멜라닌의 생성 억제 효과가 보고되었고, 이와는 반대로 서목태와 적하수²¹⁾를 이용한 연구에서는 흑모성장과 관련한 멜라닌 생성 촉진에 관련된 보고도 있었다.

여름철 많은 야외활동으로 멜라닌 생성이 촉진됨으로써 피부손상과 함께 한출과다로 元氣가 손상됨에도 불구하고 아직까지 생맥산이 자외선에 의해 손상된 피부보호 효과 등에 관련된 연구보고를 접하지 못하였다. 특히 여름에 常服할 수 있는 생맥산의 효과와 생맥산의 다양한 활용방법을 찾기 위한 일환으로 한약재를 加味한 생

Hyun Woo Jeong, College of Korean Medicine, Dongshin University, Naju, Jeonnam 520-714, Republic of Korea

E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr · Tel : +82-61-330-3524

Received : 2019/08/16 · Revised : 2019/10/11 · Accepted : 2019/10/23

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.10.33.5.267>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

맥산가미방들에 대한 효능 비교 연구 역시 접할 수 없었다.

이에 저자는 생맥산과 본방에 涼血止血하는 효능이 있어 熱病傷陰을 다스리는 生地黃을 가미한 가미방, 淸肺生津하는 효능이 있어 消渴 및 陰虛發熱에 활용하는 天門冬을 가미한 가미방, 益衛固表하는 효능이 있어 自汗과 盜汗 등에 사용하는 黃芪²²⁾를 가미한 가미방들이 미치는 미백 및 항산화효과를 비교관찰하고, 이중 최적의 가미방을 선택해 기능성 제품으로의 산업화 전략을 세우고자 흑색종 세포주인 B16F10 세포에 처리한 후 세포생존율, 멜라닌 생합성 저해율, tyrosinase 활성을 저해를 측정하였고, 또한 항산화 효과가 있는지를 확인하기 위하여 superoxide dismutase 유사활성도를 측정해 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재

본 연구에 사용한 한약재는 생맥산의 재료인 맥문동(Liriopsis Tuber, Liriope platyphylla Wang et Tang, LT), 인삼(Ginseng Radix, Panax ginseng C.A Mey, GR), 오미자(Schisandrae Fructus, Schisandra chinensis Baill., SF)와 생지황(Rehmanniae Radix, Rehmannia glutinosa (Gaertner) Liboschitz, RR), 천문동(Asparagi Radix, Asparagus cochinchinensis Merr., AD), 황기(Astragali Radix, Astragalus membranaceus Bunge, AR)를 시중에서 구입해 동신대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선을 받아 사용하였다.

2) 세포주

악성 흑색종(melanoma) 세포주인 B16F10 세포는 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다. B16F10 세포의 생육 배지는 DMEM(Gibco, USA)을 사용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)와 Antibiotic-Antimycotic(Gibco, USA)을 첨가하였으며, 실험기간 동안 B16F10 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

생맥산(Shengmaisan, SMS)은 동의보감⁹⁾에 준해 맥문동(LT) 50g, 인삼(GR) 25g, 오미자(SF) 25g을 혼합한 SMS 100g과 SMS 100g에 생지황(RR) 25g을 가미한 SMSRR 125g, SMS 100g에 천문동(AD) 25g을 가미한 SMSAD 125g, SMS 100g에 황기(AR) 25g을 가미한 SMSAR 125g을 각각 증류수 1,500 mL와 함께 전기약탕기(대웅, 한국)로 120분간 전탕하였다. 전탕액을 필터로 거른 다음, 원심분리기(Vision, Korea)를 이용하여 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 찌꺼기를 버리고 상층액만을 취하였다. 얻어진 상층액은 감압농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축한 다음, 동결건조기(일신, Korea)를 이용하여 최종적으로 SMS 36.1g(수득율 36.1%), SMSRR 27g(수득율 21.6%), SMSAD 37.2g(수득율 29.8%), SMSAR 30.3g(수득율 24.2%)의 건조분말을 얻었다.

본 연구에 사용한 시료는 인산 완충액(phosphate buffered

saline, PBS)에 동결건조 분말을 녹여 0.22 μm의 필터(PALL, UK)로 걸러 멸균을 대신하였다.

2) 세포 생존율 측정

SMS와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 등의 시료가 B16F10 세포에 미치는 생존율은 EZ-Cytox Assay kit(Dogenbio, Korea)를 사용하여 측정하였다. B16F10 세포를 배양하여 96 well plate에 각 well당 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양 후 각각의 시료를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μg/mL)로 처리한 후 24 시간 배양하였다. 그 후 EZ-Cytox용액 10 μl를 각 well에 처리한 후 2 시간을 배양한 다음 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하여 흡광도를 분석하였다.

3) 멜라닌 생합성을 측정

SMS와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 등의 시료가 멜라닌 생성에 미치는 영향은 Hosei 등의 방법²³⁾을 참고하여 측정하였다. B16F10 세포를 배양하여 24 well plate에 각 well당 2×10⁴ cells/well의 농도로 분주하고, 부착 및 안정화를 위하여 24 시간을 배양하였다. 배양이 끝난 다음 각각의 시료를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μg/mL)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 후 각 well를 PBS로 세척한 후 1 N NaOH 용액 400 μl을 첨가하고 60°C에서 1 시간 동안 용해 후 Microplate Reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

α-MSH(α-melanocyte stimulating hormone)으로 유도된 멜라닌 생합성에 대한 SMS와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 등의 시료의 효과를 알기 위하여 각각 500 μg/mL를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1 시간 배양한 다음 α-MSH 100 nM를 처리하였다. 이후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 후 각 well를 PBS로 세척한 다음 1 N NaOH 용액 400 μl을 첨가하고 60°C에서 1 시간 동안 용해한 후 Microplate Reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

4) 시험관 내 tyrosinase 활성을 측정

SMSRR과 SMSAR이 tyrosinase 활성에 미치는 효과는 Yagi 등의 방법²⁴⁾을 이용해 측정하였다. 10 mM L-DOPA 용액 0.2 mL와 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 0.5 mL를 가한 후 SMSRR과 SMSAR을 buffer에 녹이고 최종농도가 0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μg/mL가 되도록 0.1 mL를 가한 후 mushroom tyrosinase(110 unit/mL) 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 2 분간 반응한 후 Microplate Reader를 사용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성을 저해는 다음과 같이 계산하였다.

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

· A : 효소만 첨가된 반응 용액

· B : 효소와 시료가 모두 첨가된 반응 용액

· C : 시료만 첨가된 반응 용액

· D : 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응 용액

5) 세포 내 tyrosinase 활성을 측정

SMSRR과 SMSAR이 세포 내 tyrosinase 활성에 미치는 효과는 Martinez-Esparza 등의 방법²⁵⁾을 이용해 측정하였다. B16F10 세포를 cell culture dish에 각 1×10⁶ cells/dish의 농도로 분주한

후, 부착 및 안정화를 위해 24 시간 동안 incubation한 다음 SMSRR과 SMSAR을 500 µg/ml로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48 시간을 추가로 배양하였다. 배양한 후, 세포를 1% Triton X-100을 함유한 10 mM PBS 100 µl에 현탁시킨 후 세포를 vortexing한 후 1,000 rpm에서 5 분 원심분리하여 상층액을 활성 측정 효소액으로 이용하였다. tyrosinase의 활성을 측정하기 위하여 96 well plate에 기질인 L-DOPA (2 mg/ml) 100 µl를 넣고, 효소액 40 µl를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1 시간 동안 반응한 후 Microplate Reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였다. tyrosinase의 활성율은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다.

α-MSH로 세포 내 tyrosinase 활성율에 미치는 효과를 알기 위해 SMSRR과 SMSAR 500 µg/ml와 arbutin 500 µg/ml를 처리하였다. 1 시간 후 α-MSH 100 nM를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 배양하였고, 24 시간 배양 후, 세포를 1% Triton X-100을 함유한 10 mM PBS 100 µl에 현탁시킨 후 세포를 vortexing한 후 1,000 rpm에서 5 분 원심분리하여 상층액을 활성 측정 효소액으로 사용하였다. 이후 실험방법은 tyrosinase의 활성을 측정과 동일한 방법으로 진행하였다.

6) Superoxide dismutase 유사활성도 측정

SMS와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 등의 시료의 SOD 유사활성도는 Marklund 등의 방법²⁶⁾에 따라 활성 산소종을 과산화수소(H₂O₂)로 전환하는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성을 나타내었다. 양성대조군은 vitamin C 500 µg/ml을 처리하였을 때의 SOD 유사활성으로 하고, 각각의 시료를 처리한 후 나타난 SOD 유사활성을 알아보기 위하여 각각의 시료 500 µg/ml을 buffer에 녹여 10 µl씩 96 well plate에 첨가 후, 7.2 mM pyrogallol 10 µl 와 Tris-HCl Buffer(50 mM Tris aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.0) 150 µl을 첨가하여 실온에서 10 분간 반응시키고, 1N HCl 50 µl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 Microplate Reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성도는 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$SOD(\%) = (1 - A/B) \times 100$$

- A : 추출물 첨가구의 흡광도
- B : 추출물 무첨가구의 흡광도

3. 통계처리

수집된 데이터의 통계는 SigmaPlot 11.1 (www.systat.com)를 활용하여 one-way ANOVA 기법으로 처리하였고, 통계적으로 유의한 경우 사후검정은 Tukey 방법으로 사후검정하였으며, p-value가 0.05 미만인 경우에만 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

1. 세포생존율에 미치는 효과

SMS와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 등의 시료가 B16F10 세포의 생존율에 미치는 효과를 알아보기 위하여 인간 유래 악성 흑색

종 세포주에 각각의 시료를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/ml)로 처리한 후, 24 시간 배양한 후 생존율을 측정하였다(Fig. 1). 아무런 시료를 처리하지 않은 군의 B16F10 세포의 생존율을 100%로 환산하였을 때, 각각의 시료를 처리하였을 때 처리농도가 증가할수록 세포 생존율은 감소하는 경향을 보였고, 특히 SMSRR 500 µg/ml과 1,000 µg/ml을 처리하였을 때 각각 83.85±0.75%, 80.78±0.75%로, SMSAD 1,000 µg/ml을 처리하였을 때 80.26±1.29%로 아무런 시료 처리를 하지 않은 군의 세포 생존율보다 유의성 (p<0.05) 있게 억제되었다.

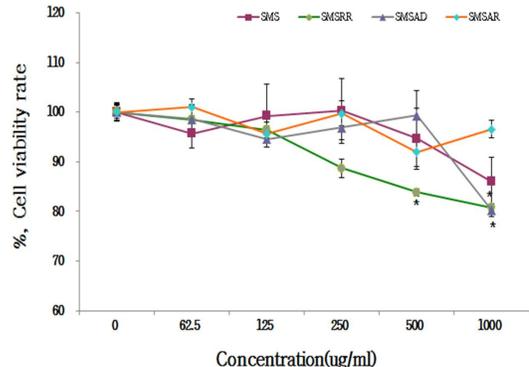


Fig. 1. Effects of Shengmaisan and ShengmaisanJiaweifang on cell viability rate in B16F10 cells. SMS: Shengmaisan was a herbal medicine composed of Ginseng Radix, Liriopis Tuber, and Schisandrae Fructus; SMSRR: SMS added with Rehmanniae Radix; SMSAD: SMS added with Asparagi Radix; SMSAR: SMS added with Astragali Radix. Results are expressed as the mean and standard deviation. * : Statistically, significance compared with non-treated group(0 µg/ml)(*; p<0.05) (n=8)

2. 멜라닌 생합성에 미치는 효과

SMS와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 등의 시료가 B16F10 세포를 이용한 멜라닌 생성에 미치는 저해효과를 알아보기 위하여 세포에 각각의 시료를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/ml)로 처리한 다음 24 시간 배양한 후 멜라닌 생합성율을 측정하였다(Fig. 2). 아무런 시료를 처리하지 않은 군의 B16F10 세포의 멜라닌 생합성율을 100%로 환산하였을 때, 각각의 시료를 처리하였을 때 처리농도가 증가할수록 멜라닌 생합성율이 감소하는 경향을 보였고, 특히 SMSRR 250 µg/ml과 500 µg/ml 농도를 처리하였을 때에는 멜라닌 생합성율이 각각 79.10±2.95%, 75.82±3.50%로 시료를 처리하지 않는 농도에 비해 유의성 (p<0.05) 있게 감소하였고, 1,000 µg/ml을 처리하였을 때의 멜라닌 생합성율은 73.77±6.45%로 다른 처리 농도의 생존율보다도 더욱 유의성 (p<0.01) 있게 억제되었다.

또한, 각각의 시료가 α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생합성율을 측정한 결과 다음과 같았다(Fig. 3). 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 멜라닌 생합성율을 100.00±0.99%라 환산하였을 때, α-MSH 유도에 의한 대조군의 멜라닌 생합성율은 121.24±3.54%로 증가하였다.

그러나 α-MSH와 arbutin을 병용처리한 양성대조군의 멜라닌 생합성율은 84.97±0.85%로 대조군보다 감소하였고, α-MSH와 SMS 500 µg/ml을 병용처리하였을 때의 멜라닌 생합성율은

98.96±1.55%로 대조군보다는 감소하였지만 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 그러나 α-MSH와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 500 µg/ml를 각각 병용처리하였을 때의 멜라닌 생합성율은 각각 83.94±1.34%, 88.60±7.10%, 84.97±2.07%로 대조군보다 유의성 (p<0.05) 있게 감소하였다.

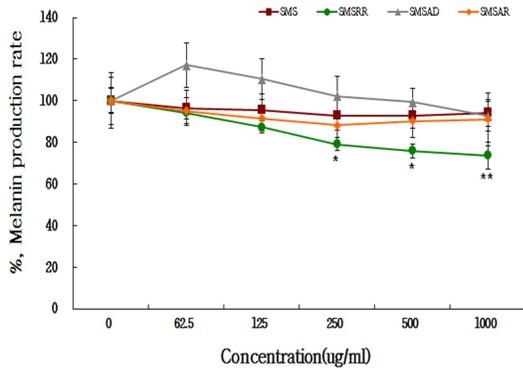


Fig. 2. Inhibitory effects of Shengmaisan and ShengmaisanJiawefang on melanin production in B16F10 cells. Results are expressed as the mean and standard deviation. * : Statistically, significance compared with non-treated group(0 µg/ml)(*; p<0.05, **, p<0.01) (n=4)

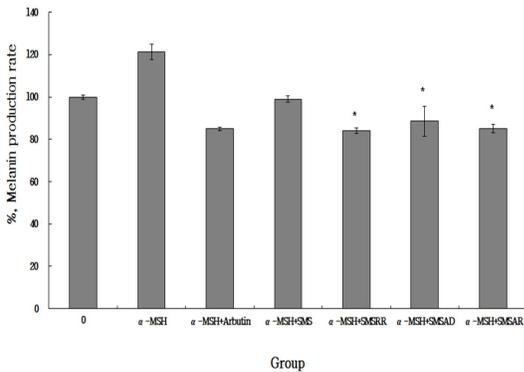


Fig. 3. Shengmaisan and ShengmaisanJiawefang Inhibits melanin production in α-MSH stimulated B16F10 cells. Results are expressed as the mean and standard deviation. Results are expressed as the mean and standard deviation. * : Statistically, significance compared with α-MSH-treated group(*; p<0.05) (n=4)

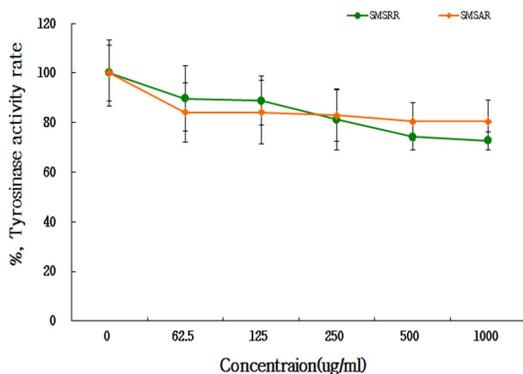


Fig. 4. The effects of SMSRR and SMSAR on tyrosinase activity *in vitro*. Results are expressed as the mean and standard deviation.

3. 시험관 내 tyrosinase 활성율에 미치는 효과

B16F10 세포의 생존율과 멜라닌 생합성율에 유의한 효과를 보인 SMSRR과 SMSAR이 시험관 내 tyrosinase 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 각각의 시료를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/ml)로 처리한 후 tyrosinase 활성율을 관찰하였다 (Fig. 4).

그 결과 tyrosinase 활성율은 시료들의 처리농도가 증가할수록 그 활성이 억제되는 경향을 보였고, 그 중에서도 SMSRR이 SMSAR보다 tyrosinase의 활성을 억제하였다.

4. 세포 내 tyrosinase 활성율에 미치는 효과

SMSRR과 SMSAR이 세포 내 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포에 각각의 시료 500 µg/ml로 처리한 다음 tyrosinase 활성 저해율을 측정된 결과 다음과 같았다(Fig. 5). 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 tyrosinase 활성율을 100.00±3.28%라 하였을 때, arbutin을 처리하였을 때는 60.80±0.53%로 활성이 유의성 (p<0.001)있게 저해되었고, SMSRR과 SMSAR를 처리하였을 때의 활성율은 각각 79.06±1.00%와 79.51±1.65%로 arbutin 처리한 양성대조군보다는 저해율이 떨어지지만 아무런 처리를 하지 않을 때보다는 유의성 (p<0.001) 있게 저해되었다.

SMSRR과 SMSAR이 α-MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포에 α-MSH와 함께 각각의 시료 500 µg/ml를 병용처리한 다음 tyrosinase 활성 저해율을 측정된 결과 다음과 같았다(Fig. 6). 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 tyrosinase 활성율을 100.00±1.97%라 하였을 때, α-MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성율은 135.88±2.67%로 증가하였고, 양성대조군으로 α-MSH와 arbutin을 병용처리하였을 때의 활성율은 109.21±2.48%로, α-MSH와 SMSRR 500 µg/ml를 병용 처리하였을 때의 tyrosinase 활성율도 110.30±6.22%로 α-MSH 단독처리시보다 유의성 (p<0.001) 있게 저해되었다.

그러나 α-MSH와 SMSAR 500 µg/ml를 병용처리하였을 때의 tyrosinase 활성율은 125.33±1.87%로 양성대조군보다 오히려 유의성 (p<0.001) 있게 증가하였다.

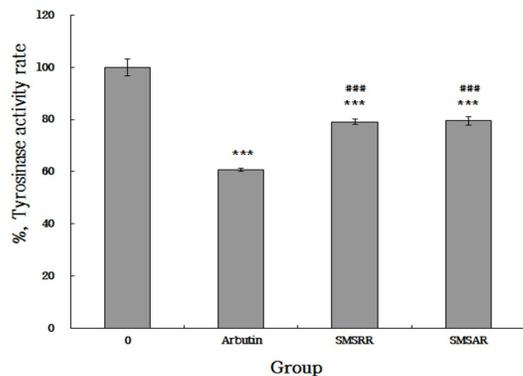


Fig. 5. Inhibitory effects of SMSRR and SMSAR on tyrosinase activity in B16F10 cells. Results are expressed as the mean and standard deviation. * : Statistically, significance compared with 0(non-treated) group(***) p<0.001) (n=4) # : Statistically, significance compared with Arbutin group(###; p<0.001) (n=4)

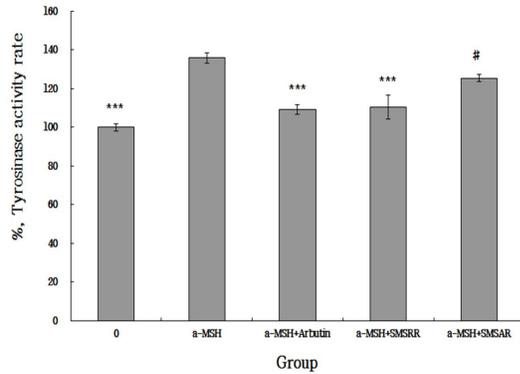


Fig. 6. Inhibitory effects of SMSRR, SMSAR and α-MSH on tyrosinase activity in B16F10 cells. Results are expressed as the mean and standard deviation. * : Statistically, significance compared with α-MSH group(***; p<0.001) (n=4) # : Statistically, significance compared with α-MSH and α-MSH+arbutin group(###; p<0.001) (n=4)

5. Superoxide dismutase 유사활성에 미치는 효과

SMS와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 등의 시료가 SOD 유사활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 각각의 시료를 500 µg/ml를 처리한 다음 SOD 유사활성도를 측정된 결과 다음과 같았다(Fig. 7).

각각의 시료가 SOD 유사활성에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 아무런 추출물을 하지 않은 대조군의 활성도를 0%로, vitamin C로 처리한 양성대조군의 유사활성도를 100.00±0.55%라 하였을 때, 각각의 시료를 처리한 실험군들(SMS, SMSRR, SMSAD, SMSAR)의 유사활성도는 양성대조군보다는 낮았지만 SMSRR과 SMSAR을 처리하였을 때의 SOD 유사활성도는 38.22±3.07%와 41.96±3.23%로 SMS만을 처리하였을 때보다는 유의성 (p<0.05, p<0.001) 있게 증가하였다.

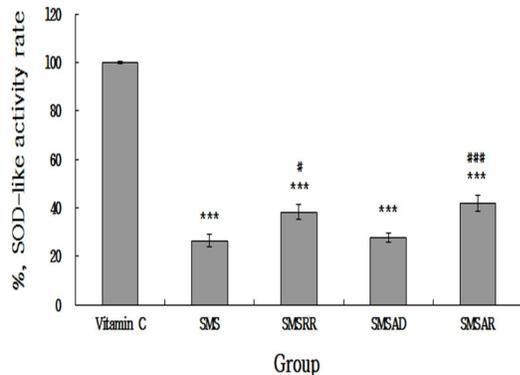


Fig. 7. Superoxide dismutase-like activity of Shengmaisan and ShengmaisanJiweifang depending on concentration. Results are expressed as the mean and standard deviation. * : Statistically, significance compared with Vitamin C treated group(***; p<0.001) (n=8) # : Statistically, significance compared with SMS treated group(#; p<0.05, ### ; p<0.001) (n=8)

고찰

생맥산은 『景岳全書』¹⁰⁾에 인삼 五錢, 맥문동, 오미자 各 三錢으로 되어 있으며, 益氣斂汗, 養陰生津하는 효능이 있어 熱傷元氣

로 인한 肢體倦怠, 氣短口渴, 汗出不止 등에 사용한다 하였다. 이후 『東醫寶鑑』⁹⁾에서는 맥문동 二錢, 인삼, 오미자 各 一錢으로 水煎服하되 여름철 元氣를 복돋기 위해 물 대신 이를 복용하거나 향기와 감초 各 一錢을 加하여 服用하라 하였고, 康도 『內外傷辨惑論』에 근거해 強心과 補津液하는 효능이 있어 여름철에 생맥산을 상복할 수 있다 하였다¹¹⁾.

생맥산을 구성하는 약물들의 효능을 살펴보면²²⁾ 인삼은 五加科에 속한 다년생초본인 인삼의 根으로 大補元氣, 固脫生津, 安神하는 효능이 있어 勞傷虛損, 食少, 倦怠, 健忘, 頭暈頭痛, 久虛不復 등의 일체 氣血津液不足 증상에 활용되고 있고, 맥문동은 百合科에 속한 다년생초본인 맥문동의 塊根으로 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津하는 효능이 있어 肺燥乾咳, 陰虛勞嗽, 心煩失眠, 虛勞煩熱, 熱病傷津, 咽乾口燥 등에 활용되고 있으며, 오미자는 오미자과에 속한 落葉 木質藤本인 오미자 또는 華中오미자의 완숙한 果實을 건조한 것으로 收斂固澀, 益氣生津, 補腎寧心하는 효능이 있어 肺虛喘咳, 口乾作渴, 自汗, 盜汗, 勞傷羸瘦, 滑精 등에 활용되고 있다.

생맥산의 최근 연구동향을 살펴보면, 이 등¹⁴⁾은 생맥산이 위장관 운동성을 개선시켜 다양한 위장관 운동성 질환 및 당뇨병에 의한 소화기능 이상 등에 활용될 수 있을 것이라고, 김 등¹⁶⁾은 생맥산이 자외선 조사에 의한 피부각질세포의 상해에 보호작용이 있으며, 피부의 광노화에 관여하는 인자들을 억제하였다고, 지¹⁵⁾는 감초, 길경을 加한 가미생맥산이 항산화 및 항염증의 주요인자들(DPPH 라디칼 소거능, ROS 생성량, NO 생성량, 사이토카인 생성량)에 대해 유의한 반응을 나타내 산화적 손상 및 염증성 질환에 활용될 수 있다고 하였다. 또한, 생맥산과 근력운동과의 상관관계에 관한 연구를 살펴보면, 권 등¹²⁾은 생맥산이 비만 중년여성의 신체조성 및 면역세포의 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과 생맥산을 복용하면서 걷기운동을 병행하면 WBC, Hb, Hct, Platelet의 변화에 유의함을 보여 운동보조물로서의 활용가치가 높다고, 최 등¹³⁾은 생맥산이 카누선수들의 운동수행능력과 피로물질에 미치는 영향을 관찰한 결과 최대 산소섭취량, 최대심박수, 혈중젖산농도, 암모니아, 크레아티닌산효소 및 젖산탈수소효소 활성도에서 유의한 변화를 나타내 에어고제닉 에이드 효과가 있다고 보고하였다. 그 외에도 허 등²⁷⁾은 홍삼, 오미자, 맥문동으로 구성된 생맥산을 음료로 개발하기 위해 관능검사를 실시한 결과로 최적의 배합조건과 희석 배수에 따른 당도를 제시하기도 하였다.

최근, 지구환경의 변화로 오존층이 파괴되어 자외선에 더 많이 노출된 피부의 건강이 위협을 받고 있다²⁸⁾. 이러한 자외선 흡수에 의한 세포 손상을 방어하기 위해 멜라닌 색소가 생성하게 된다³⁾. 또한 햇빛 손상으로 콜라겐 또는 엘라스틴의 합성이 저하되면 수분 보유량이 떨어져 피부의 탄력이 없어지고, 피부 주름 등이 발생해 피부의 노화를 촉진한다²⁹⁾. 멜라닌은 검은 색소와 단백질의 복합체로 피부 및 머리카락의 색깔을 결정짓는 색소 중의 하나이며, 과도하게 합성되게 되면 피부 표면에 멜라닌이 침착되어 기미, 주근깨 등을 포함한 다양한 색소가 피부에 침착하게 된다²⁾.

여름철 더위와 氣에 관련된 한의학적 내용을 찾아보면, 『素問·舉痛論』에 “炅則腠理開, 營衛通, 汗大泄, 故氣泄矣”라 하였고, 『素問·刺志論』에서도 “氣虛身熱, 得之傷暑”라 하여⁷⁾ 여름철 더위로

汗孔이 열려 땀을 흘리게 되면 氣도 같이 빠져나가 元氣가 부족하게 된다 하였으며, 葉天士의 『三時伏氣外感篇』과 薛生白的 『濕熱病篇』에서도 “暑熱傷氣”와 “暑月熱傷元氣”라 하여 여름철 더위로 인해 元氣가 손상된다 하였다⁸⁾.

이에 저자는 자외선으로 인한 피부보호 및 生津止渴할 수 있는 기능성 제품을 개발하고자 생맥산 본방과 淸熱生津, 涼血止血하는 효능이 있어 熱病傷陰에 사용하는 생지황(Rehmanniae Radix), 滋陰潤燥, 淸肺生津하는 효능이 있어 생지황과 맥문동을 배합해 皮膚屑起에 사용하는 천문동(Asparagi Radix), 生用으로 사용할 경우 益衛固表, 托毒生肌하는 효능이 있어 自汗, 盜汗, 癰疽潰久不斂에 활용되는 황기(Astragali Radix)를 각각 배합한 가미방을 만들어 일차적으로 SMS와 생맥산가미방(SMSRR, SMSAD, SMSAR)이 흑색종 세포주인 B16F10 세포에 미치는 세포생존율과 멜라닌 생합성 저해율을 측정하였다. 이후 그 결과들을 바탕으로 최적의 배합이라 생각되는 시료를 선택하여 이차적으로 멜라닌 생합성 저해에 관여할 것으로 판단되는 tyrosinase 활성을 저해 효과를 측정해 그 기전을 추론하였고, 이와 함께 여름철에 응용할 수 있어 SOD 유사활성도를 측정해 항산화 효과도 관찰하였다.

SMS와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 등의 시료가 B16F10 세포의 생존율에 미치는 효과를 관찰한 결과(Fig. 1), 각각의 시료를 처리하였을 때 처리농도가 증가할수록 세포 생존율은 감소하는 경향을 보였고, 특히 SMSRR 500 µg/ml과 1,000 µg/ml, SMSAD 1,000 µg/ml을 처리하였을 때 아무런 시료 처리를 하지 않은 군의 세포 생존율보다 유의성 ($p < 0.05$)있게 억제하였다.

SMS와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 등의 시료가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 B16F10 세포에 각각의 시료들을 처리하였다. 그 결과 처리농도가 증가할수록 아무런 처리하지 않았을 때보다 멜라닌 생합성율이 농도의존적으로 감소하였고, 특히 SMSRR은 농도의존적으로 멜라닌 생합성율을 유의성 ($p < 0.05$, $p < 0.001$) 있게 억제하였다(Fig. 2). 이와 같은 결과와 생존율의 결과를 종합해보면, SMSRR의 B16F10 세포에 미친 생존을 억제해 멜라닌 생합성을 억제하는 과정에서 도출된 결과라고 여겨지는 한편 미백효과도 있음을 시사해 준다 판단된다.

그러나 SMSAD의 경우 500 µg/ml을 처리할 때까지 아무런 처리를 하지 않은 군과 유사한 결과를 보이다가 1,000 µg/ml의 고농도를 처리하였을 때 두드러진 세포 생존을 억제현상이 나타나 약물의 독성이 있는 것으로 의심하였으나 본초서에서도 천문동 자체는 유독한 약물²²⁾이 아니고 지금까지 발표된 연구결과에도 만성염증 질환에 항염효과가 있다고 발표되었을 뿐 독성에 관련된 연구는 없었다. 그러나 본 결과는 연구진행 과정상 세포 배양 2시간 외의 다른 추가 배양 시간에서도 같은 결과를 나타내 연구과정상의 문제이거나 독성에 의한 것으로 판단할 수 있으나 본 연구자는 연구진행상 문제점을 발견하지 못해 독성에 대한 여부는 더욱 더 연구를 진행해야 할 것으로 생각된다.

피부가 자외선에 과다하게 노출되거나 α -MSH 자극에 의해 tyrosinase 효소가 활성화되면 더 많은 멜라닌 색소기 생성하게 된다^{6,30)}. 이 때 이러한 tyrosinase의 활성을 억제하기 위한 물질로 지금까지 알려진 것은 resorcinol, hydroquinone 등과 그 유도체

들이 있지만 피부의 안전성과 제형 등의 문제로 제한된 양의 arbutin 등만이 미백 첨가제로 사용되고 있다³¹⁾.

상기 연구과정상 세포독성이 의심되는 용량을 제외하고 각각에서 유의성을 나타낸 각 시료의 최적 용량(500 µg/ml)을 선정한 후 α -MSH에 의해 유도된 멜라닌 생합성율에 미치는 효과를 확인하기 위하여 양성대조군으로 arbutin을 사용하여 측정하였다. 측정된 결과 α -MSH와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 500 µg/ml을 각각 병용 처리하였을 때의 멜라닌 생합성율은 α -MSH 단독 처리군보다 유의성 있게 감소하였고, SMS 처리군에서는 통계적인 유의성은 없어 다른 약물을 가미하였을 때 미백효과가 우수한 것으로 생각되었다. 또한 α -MSH와 SMSAR 병용처리군에서는 양성대조군(α -MSH와 arbutin 병용처리)의 멜라닌 생합성율과 유사하게 나타났으며, 특히 α -MSH와 SMSRR를 병용처리한 군에서는 양성대조군의 멜라닌 생합성율보다도 감소하였다. 이는 생지황이 淸熱生津하고 涼血하는 효능이 있어 임상적으로 發斑發疹 등에 활용²²⁾되기 때문에 자외선 등의 산화적 스트레스로 인해 생성된 멜라닌을 미백 첨가제보다도 오히려 더욱 억제하는 것으로 생각되는 바, 한의학 산업의 일환으로 생맥산에 생지황을 가미하면 한방 미백제로써의 개발 가능성도 있다 판단된다. 이는 자연삼이 미백화장품 원료로 활용가능하다 평가한 이 등³²⁾의 결과와도 같은 것으로 생맥산가미방이 음료로써의 가능성 뿐 아니라 미백화장품 소재로도 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

또한, 세포 생존율과 멜라닌 생합성 저해에 유의성을 나타낸 시료(SMSRR, SMSAR)를 선정 한 후 비세포 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과를 관찰하였다. 그 결과, 처리농도가 증가할수록 tyrosinase 활성이 저해되었고(Fig. 4), B16F10 세포 내 tyrosinase 활성을 역시 SMSRR과 SMSAR를 처리하였을 때 양성대조군으로 사용한 arbutin 처리시보다는 활성율이 약하지만 아무런 처리를 하지 않은 대조군보다는 유의성 있게 저해되었다(Fig. 5). 또한, α -MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과를 확인한 결과 α -MSH와 SMSRR 500 µg/ml을 병용처리하였을 때의 tyrosinase 활성율이 대조군보다 유의성 있게 저해되었고, 양성대조군과는 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 6). 이는 생맥산에 생지황을 가미하였을 때 나타난 세포 생존율의 감소 및 멜라닌 생합성을 억제해 단순히 세포독성에 의한 것이라 tyrosinase의 활성을 억제해 나타난 결과인 것으로 판단되며, 이는 SMSRR이 자외선 등에 의한 외부 자극을 차단할 수 있는 기능성 제품 개발에 중요한 자료가 된다 생각되어 향후 이에 대한 연구를 진행코자 한다.

자외선은 피부에 영향을 주는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하는 환경적 요인 중에서 하나이다. 이러한 산화적 스트레스는 피부세포 내 SOD를 비롯한 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소의 기능을 저해시킴으로써 피부세포의 생존율을 떨어뜨리고³³⁾, 멜라닌 세포의 소기관인 melanosome의 활성을 증가시킨다⁴⁾. 다시 말해 ROS가 과량으로 생성되면 세포에도 산화적 손상을 입혀 성분 및 구조를 변화시키게 된다³⁴⁾. 이와 관련해 전 등³⁵⁾은 미강 에탄올 추출물이 항산화 효과와 함께 ROS, human dermal fibroblast 세포 내의 소거능을 농도의존적으로 산화적 스트레스에 의한 손상을 억제하였다고 보고하

였고, 김 등³⁶⁾도 바나나 껍질 에탄올 추출물을 이용해 멜라닌 합성과 함께 항산화 효과를 관찰한 결과 vitamin C와 비슷한 항산화 활성 효과를 나타내어 바나나 껍질이 미백 및 항산화 효과가 있다고 보고하였다.

ROS를 제거함으로써 산화적 손상을 줄일 수 있는 대표적인 항산화 비타민은 beta-carotin, vitamin C (Vit. C)와 vitamin E (Vit. E) 등이 있어³⁷⁾ 양성 대조군으로 vitamin C를 사용해 항산화 효과를 관찰하였다. 아무런 추출물을 처리하였을 때의 대조군의 활성도를 0%라 하고, vitamin C를 처리한 양성대조군의 SOD 유사활성도를 100%라 하였을 때 SMS와 SMSRR, SMSAD, SMSAR 등의 시료가 SOD에 미치는 영향은 다음과 같았다. 각각의 시료 500 µg/mL를 처리하였을 때의 SOD 유사활성도는 vitamin C로 처리한 양성대조군보다는 감소하였고, 특히 SMSRR의 SOD 유사활성도는 SMS만을 처리하였을 때보다 유의성 있게 증가하였으며, SMSAR에서는 더욱 두드러진 증가현상을 보였다. 이는 황기가 益衛固表, 補中益氣하여 自汗, 勞倦 등의 일체 氣血虧損 증상에 활용²²⁾되고, 황기가 낮은 농도에서도 SOD를 활성화시켜 높은 항산화 효과 갖고 있다고 한 보고³⁸⁾ 등을 볼 때 생맥산에 황기를 배합하면 항산화 작용이 더욱 우수한 것으로 판단된다.

이상의 결과, 생맥산과 생맥산가미방들의 미백효과를 비교 관찰한 결과 상기 4개의 시료 중 생맥산가미방이 tyrosinase 활성과 관련해 멜라닌 생합성에 유의하게 반응해 한방 미백 소재로서의 활용이 가능할 것으로 판단된다. 또한 생맥산가미방은 상기 시료 중에서 항산화효과가 우수한 것으로 나타나 여름철 야외 활동시 기능성 음용제로서의 개발 가능성도 엿볼 수 있었다.

결 론

생맥산(SMS)과 생맥산가미방(생지황을 가미한 SMSRR, 천문동을 가미한 SMSAD, 황기를 가미한 SMSAR)이 미치는 미백효과를 관찰하기 위하여 각각의 시료를 흑색종 세포주인 B16F10 세포에 처리한 후 세포생존율, 멜라닌 생합성 저해율, tyrosinase 활성을 저해 및 superoxide dismutase 유사활성도를 측정 후 비교 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

B16F10 세포의 생존율은 각각의 시료를 처리하였을 때 처리농도에 의존해 억제되는 경향을 보였고, 특히 SMSRR 500 µg/mL 이상을 처리하였을 때 유의성 있게 억제되었다.

멜라닌 생합성은 각각의 시료를 처리하였을 때 억제되는 경향을 나타내었고, 특히 SMSRR 250 µg/mL 이상을 처리하였을 때 유의성 있게 저해되었다. 특히, SMSRR과 SMSAR 500 µg/mL를 각각 α-MSH와 병용처리하였을 때의 멜라닌 생합성 저해율은 α-MSH와 arbutin을 병용처리한 양성대조군과 유사하였고, α-MSH를 단독처리한 대조군보다는 모든 시료 병용처리군에서 유의성 있게 저해되었다.

Tyrosinase 활성은 SMSRR과 SMSAR을 처리하였을 때 비세포 내에서 저해되었고, 세포 내에서는 아무런 처리를 하지 않았을 때보다 유의성 있게 억제되었다. 또한 α-MSH와 SMSRR를 병용처리한 처리군에서는 양성대조군과 같이 대조군보다 유의성 있게 저

해되었다.

SOD 유사활성도는 생맥산과 생맥산가미방 처리군이 vitamin C를 처리한 양성대조군보다는 감소하였지만 SMSRR과 SMSAR을 처리한 처리군에서는 SMS만을 처리한 처리군보다 SOD 활성도가 유의성 있게 증가하였다.

이상과 같이 생맥산과 생맥산가미방 추출물들은 tyrosinase의 활성을 저해함으로써 멜라닌의 생성을 억제하였고, 특히 생맥산에 생지황을 가미하였을 때 자외선 등의 산화적 스트레스에 대한 방어적인 효과가 우수해 여름철에 한방 미백 기능성 소재로 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

2018년 동신대학교 교내연구비 지원하에 이루어졌음.

References

1. Lee HS, Yoon JN. Inhibitory Activity of Advanced Glycation Endproducts(AGE) Formation of Edible Plants for Development of Anti-Wrinkle Ingredients. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2010;39(2):186-92.
2. Prota G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, J. Invest. Dermal 1980;75:122-6.
3. Wang KH, Lin RD, Hsu FL, Huang YH, Chang HC, Huang CY, Lee MH. Cosmetic application of selected traditional Chinese herbal medicines. J. Ethnopharmacol. 2006;106:353-9.
4. Oetting WS, King RA. Molecular basis for type I (tyrosinase-related) oculocutaneous albinism: Mutations and polymorphism of the human tyrosinase gene. Human Mutation 1993;2(1):1-6.
5. Kikuchi H, Hara S, Ishiguro S, Tamai M, Watanabe M. Detection of point mutation in the tyrosinase of a Japanese albino patient by a direct sequencing of amplified DNA. Hum. Genet. 1990;85:123-4.
6. Shibahara S, Tomita Y, Tagani H, Muller RM, Cohen T. Molecular basis for the heterogeneity of human tyrosinase. Tohoku J. Expmed. 1988;156:403-14.
7. Yang WJ. Huangdineijingsuwen, Chengfushe, 1980. p. 306, 388,
8. Song LB. Zhongyibingyinbingjuxue, beijing, Renminweishengchubanshe 1987. 88 p.
9. Heo J. Dongyibogam, Seoul, Namshandang, 1983. 410 p.
10. Zhang ZJ. Jingyuequanshu(xia), Seoul, Daxingwenhuashe, 1997. 477 p.
11. Kang SS. Bareun-Precription of Korean medicine, Seoul, Daxingwenhuashe, 1996. p. 92-3.
12. Kwon KW, Cho HK. The Effect of Sang-Maek-San

- Supplementation on the Body Composition and Immune Cells in Obese Middle-Aged Women The Korea Journal of Sports Science 2009;18(4):1053-63.
13. Choi MS, Cho HK, Lee DO, Yang JC. The Effects of Saeng-maek-san Supplementation on Canoeist Performance and Blood Fatigue Elements in Canoe, Journal of Korean Sport Research, 2007;18(6):297-308.
 14. Lee MC, Park JR, Shim JH, Ahn TS, Kim BJ. Effects of Traditional Chinese Herbal Medicine Shengmai-San and Pyungwi-San on Gastrointestinal Motility in Mice, J. Korean Med. Obes. Res. 2015;15(2):68-74.
 15. Ji JG. Anti-Oxidative and Anti-inflammatory Effect of Combined Extract and Individual Extract of GamiSaengmaeksan, Kor. J. Herbol. 2016;31(1):69-75.
 16. Kim ES, Yoo DY. Protective Effect of Processed Saengmaek-san(SM) on Cell Damage in UV-exposed HaCat Cell, The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology, 2011;24(2):33-51.
 17. Song TI, Chang HJ, Lim CY, Lee SY. Anti-oxidant and Anti-melanogenesis Activity of Extracts from Phragmites rhizoma, Salicomia herbacea and Prunus mume, J. Invest Cosmetol. 2018;14(1):9-17.
 18. Cho EJ, Byun EH. Antimelanogenic effect and whitening of crude polysaccharide fraction extracted from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo, Korean J. Food SCI. TECHNOL. 2019;51(1):58-63.
 19. Lee JH, Yoon YC, Kim JK, Park YE, Hwang HS, Kwon GS, Lee JB. Antioxidant and Whitening Effects of the Fermentation of Barley Seeds (*Hordeum vulgare* L.) Using Lactic Acid Bacteria, Journal of Life Science 2018;28(4):444-53.
 20. Woo CY, Kim DC. Skin Regeneration, Anti-wrinkle, Whitening and Moisturizing Effects of Cheongsangbangpung-tang Aqueous Extracts with Cytotoxicity, J. Korean Obstet Gynecol. 2017;30(2):49-70.
 21. Lee EB, Kim MM. Effect of Ethanolic Extracts Mixed with Grains and *Fallopia multiflora* on Melanogenesis, Journal of Life Science 2019;29(4):461-9.
 22. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine Schools. Herbology. Seoul, Younglimsa. 2012. p. 231-3, 573-9, 645-8, 683-4.
 23. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α . 25-Dihydroxyvitamin D3 and Retinoic Acid. Cancer Res. 1985;45(4):1474-8.
 24. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effects of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Med. 1986;3981:517-9.
 25. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur. J. Biochem. 1998;255:139-46.
 26. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biol. Chem. 1974;47:468-74.
 27. Hur NY, Baek EK. Development of Traditional Drinks using Sangmaksan, The Korean Journal of Culinary Research 2005;11(3):166-78.
 28. Fisher GJ et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, N. Engl. J. med. 1997;337:1419-28.
 29. Ryu IS, Lee SJ, Lee SW, Mun YJ, Woo WH, Kim YM, Lee JC, Lim KS. Dermal Bioactive Properties of the Ethanol Extract from Flowers of *Lespedeza bicolor*. The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 2007;20(2):1-9.
 30. Sulaimon S, Kitchell B. The Biology of Melanocytes. Veterinary Dermatology 2003;14(2):57-65.
 31. Ando, S.O., Ando, Y.S., Mishima, Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. J. Invest. Dermatol. 1993;100:150-155.
 32. Lee HS. Skin lightening effect of fermented Panax ginseng extract, Journal of the Korea Convergence Society 2019;10(2):285-92.
 33. Liu, T.H., Beckman, J.S., Freeman, B.A., Hogan, E.L., Hsu, C.Y. : Polyethylene glycolconjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. Am J. Physiol. 1989;256:H589-H593.
 34. Cabisco E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int. Microbiol. 2000;3:3-8.
 35. Jeon SB, Jeon JA, Jeong BG. Anti-oxidative Activities and Tyrosinase Inhibition Ability of Rice Bran Ethanol Extract. J. Kor. Soc. Cosm. 2010;16(2):602-6.
 36. Kim JR, Kim MM. Positive Effect of *Musa paradisiaca* Peel Ethanolic Extract on Antioxidant Activity and Melanin Synthesis, Journal of Life Science 2018;28(7):802-10.
 37. Ye Y, Li J, Yuan Z. Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. PLoS One 8, e56803. 2013.
 38. Park CI. Study on Effects of Anti-oxidant and Viscoelastic on Emulsion by the Extract of *Astragalus membranaceus*, Kor. J. Herbology 2012;27(2):93-7.