

UVB에 노출된 HaCaT 인간 각질세포에서 상심자의 보호효과

이종록[#], 박숙자^{*}

대구한의대학교 제약공학과

Protective effect of Mori Fructus in HaCaT human keratinocytes exposed to UVB

Jong Rok Lee[#], Sook Jahr Park^{*}

Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objective : Mori Fructus has been used to relieve thirst, and treat dizziness, tinnitus, and insomnia caused by poor constitution. This study was performed to investigate the protective effect of the ethanol extract of Mori Fructus (MF) in ultraviolet B (UVB)-induced apoptotic cell death in human keratinocyte cells.

Methods : MF was prepared by extracting 100 g of Mori Fructus in 1 L of 100% ethanol for 48 h. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to measure cell viability. Apoptosis was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay, and the expression of apoptosis-related proteins was observed by Western blot. Tyrosinase activity was measured with a colorimetric commercial kit.

Results : MF promoted cell vitality and inhibited apoptosis of UVB-induced HaCaT cells. MF pretreatment reduced TUNEL-positive cells and increased the expression of caspase-3 and -9. MF also displayed antioxidant effect with high radical scavenging ability. At 2 mg/ml concentration, the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical inhibition rates were $55.3 \pm 4.6\%$ and $48.5 \pm 1.3\%$, respectively. Furthermore, MF showed a concentration-dependent inhibitory effect on tyrosinase.

Conclusion : These results suggest that MF functions as a protective regulator in UVB-induced HaCaT cells by regulating apoptosis and partially exerting antioxidant effects. In addition, the tyrosinase inhibitory effect of MF shows the potential for MF to be used for skin pigmentation.

Key words : Mori Fructus, UVB, apoptosis, caspase, tyrosinase

I. 서 론

기후변화로 인해 근래에 찾아보기 힘들었던 기록적인 폭염이 유럽을 포함한 전세계를 강타하고 있다. 이러한 이상 고온현상과 기후변화는 화석연료의 연소로 발생하는 이산화탄소, 에어콘 냉매와 스프레이 제품에 사용되는 CFC (Chloro fluoro

carbon), methane 등과 같은 온실기체가 대기로 배출되어 나타난다^{1,2)}. 특히 CFC는 성층권의 오존층을 파괴하여 자외선이 직접적으로 지구에 도달하게 하여 문제가 된다³⁾. 자외선은 짧은 파장의 고에너지를 가진 빛으로 DNA를 손상시켜 지구 생명체에 해를 입히게 되는데 자외선에 의한 피부 자극은 피부 노화를 촉진시키고 피부암의 발생도 증가시킨다^{4,5)}.

*Correspondence to: Sook Jahr Park, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-819-1298

· Fax : +82-53-819-1406

· E-mail : haany@dhu.ac.kr

#First author : Jong Rok Lee, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-819-1804

· Fax : +82-53-819-1406

· E-mail : jrlee@dhu.ac.kr

· Received : 12 June 2023

· Revised : 10 July 2023

· Accepted : 25 September 2023

파장의 크기에 따라 자외선은 UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm), UVC (100-280 nm)로 구분할 수 있으며 중간 길이의 파장을 가지는 UVB는 일광화상, 피부 홍반을 유발하고 피부 표피의 맨 아래에 있는 기저층까지 침투하여 색소형성세포인 melanocytes를 자극해 기미를 발생시킨다^{6,7)}. 또한 UVB에 노출되어 세포의 DNA 손상이 발생하면 세포는 죽거나 암화 과정을 통해 암세포로 변하기도 한다. 피부 각질형성세포에서 UVB에 의한 염증반응⁸⁾, 세포자멸사⁹⁾ 등이 보고되어 있다.

상실 또는 오디라고 불리는 상심자(桑椹子; Mori Fructus)는 뽕나무(*Morus alba* Linné)의 완전히 익기 전의 열매로서 따뜻한 성질을 가지며 달고 신 맛이 난다¹⁰⁾. 한의학에서 상심자는 심경(心經), 간신경(肝腎經)으로 보혈자음(補血滋陰), 생진윤조(生津潤燥)하는 효능이 있으며 소갈(消渴)을 해소하고 허한 체질에서 나타나는 어지러움, 이명, 불면증 등을 치료하는데 사용되었다^{10,11)}. 주요성분으로는 anthocyanin 색소인 cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside과 niacin, rutin, ascorbic acid 등이 함유되어 있고^{12,13)} 항산화^{11,14)}, 항염증^{15,16)}, 항스트레스¹⁷⁾, 혈관신생억제¹⁸⁾, 항당뇨¹⁹⁾ 등에 대한 활성이 보고되었다. 특히 상심자의 항산화 및 항염증 활성은 피부 노화 개선과 관련하여 연구가 많이 진행되었으며 피부 질환 및 이너뷰티 소재로 그 활용 가능성을 평가받고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 하지만 UVB에 노출된 각질형성세포의 세포자멸사에 대한 상심자의 효능 연구는 보고되어 있지 않다.

기후변화는 극단적인 지구온도 변화와 더불어 자외선 지수의 상승에도 영향을 주고 있기 때문에 자외선에 노출된 피부를 보호할 수 있는 본초의 개발은 건강수명 연장을 위한 하나의 대안이 될 수 있다. 따라서 본 실험에서는 UVB를 조사한 HaCaT 각질형성세포에서 상심자가 세포자멸사와 산화적 손상에 미치는 효과와 색소침착에 주요한 tyrosinase 저해 활성을 살펴보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Penicillin-streptomycin, fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM/F12)는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), caspase-3, caspase-9, β -actin 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Protease inhibitor cocktail, BCA protein assay kit, chemiluminescence detection kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Tyrosinase inhibitor screening kit는 Bio Vision (Milpitas, CA, USA)에서 구입하였고 ABTS, DPPH, MTT 및 기타 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 상심자 에탄올 추출물의 제조

뽕나무(*Morus alba* Linné)의 열매인 상심자(Mori Fructus)는 대원약업사(Daegu, Korea)에서 구입하여 품질 검증을 실시한 후 추출물 제조에 사용하였다. 건조 중량으로 100 g의 상심자를 100% 에탄올 1 L에 넣고 상온에서 48시간 동안 추출한 후에 filter paper (Toyo Roshi Kaisha Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하고 진공농축하였다. 동결건조는 ultra-low temperature freezer (FDU-1100; EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 12시간 동안 진행하였으며, 추출물은 사용 전까지 -20°C 에 보관하였다. 상심자 에탄올 추출물(MF)의 최종 수율은 7.13%였다.

3. 세포 배양 및 MTT assay

HaCaT cell은 조선대 약대에서 분양받아 10% FBS, 100 units/ml penicillin이 포함된 DMEM/F12 배지를 사용하여 80-90%의 confluence 범위에 도달하도록 배양하여 실험에 사용하였다. MTT assay로 세포 생존율을 측정하기 위해 24 well plate에 HaCaT cell (1×10^5 cells/well)을 분주하고 MF를 농도별(0, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 18 시간동안 전처리한 후에 UV crosslinker (BoTeck, Gunpo, Korea)를 사용하여 300 mJ/cm^2 의 세기로 UVB (312 nm)에 노출시켰다. 5 시간 후, 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척하고 0.5 mg/ml MTT 용액으로 반응(37 $^{\circ}\text{C}$, 4 h)시켜 생성된 formazan을 DMSO로 녹여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조세포에 대한 백분율로 다음과 같은 수식에 의해 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{Cell viability (\%)} \\ &= 100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / \\ &(\text{absorbance of control}) \end{aligned}$$

4. Radical 소거 활성 측정

Radical 소거 활성은 DPPH와 ABTS를 사용하여 측정하였다. DPPH radical solution은 0.2 mM의 농도로 준비하여 다양한 농도(0.25-2.0 mg/ml)의 MF와 동량으로 혼합하였고 암실에서 30분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical solution은 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 동량으로 섞어 실온에서 반응 (12-16 h)시켜 제조하였다. 실험에 사용하기 위해 ABTS radical solution은 메탄올에 희석하여 734 nm에서 흡광도가 0.70 ± 0.02 가 되도록 준비하였고 MF와 동량으로 혼합하여 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조물질로 ascorbic acid를 사용하였으며 DPPH와 ABTS radical 소거 활성은 다음 수식에 따라 저해 백분율로 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{Inhibition \%} \\ &= [(\text{absorption of control} - \text{absorption of sample}) / \\ &(\text{absorption of control})] \times 100 \end{aligned}$$

5. TUNEL assay

HaCaT cell을 4 well chamber slide의 well당 1×10^5 개의 농도로 배양하여 MF를 18 시간 동안 전처리하였다. PBS로 세포를 세척하고 300 mJ/cm^2 의 세기로 UVB에 노출시킨 후 5 시간 더 배양하였다. TUNEL-positive cell은 배양세포를 formaldehyde로 고정하고 *in situ* cell death detection kit, POD (Roche, Basel, Switzerland)로 염색하여 light microscope (Eclipse Ti-E, Nikon, Japan)로 관찰하였다.

6. Western blot analysis

전세포 추출액 (whole cell lysates)을 얻기 위해 protease inhibitor cocktail이 포함된 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl)를 첨가하여 4°C 에서 30분 동안 lysis시켰다. BCA protein assay kit로 단백질 정량한 후 단백질 ($30 \mu\text{g}/\text{lane}$)을 10%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. Nitrocellulose membrane으로 전이한 단백질에 일차항체 및 이차항체를 반응시켜 준 다음 enhanced chemiluminescence detection kit로 발광시켜준 후에 ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 단백질 밴드를 확인하였다.

7. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위해서 MF를 여러 농도 (1, 2, 5, 10 mg/ml)로 준비하고 kojic acid (0.75 mM)를 대조물질로 사용하여 tyrosinase 저해 활성을 조사하였다. Tyrosinase Inhibitor Screening Kit의 guide에 따라 효소액을 준비하였으며 30°C 에서 60분간 효소 활성을 측정하였다.

8. 통계적 검정

실험 결과는 mean \pm S.D.로 나타내었으며 유의성 검정은 윈도우용 SPSS ver. 23 프로그램을 사용하여 one way analysis of variance (ANOVA) 분석을 실시하였다. 사후 검정은 Tukey HSD를 사용하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

III. 결 과

1. UVB에 노출된 HaCaT 세포 손상에 대한 MF의 보호 효과

HaCaT cell에 MF (3-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 18시간 전처리한 후에 300 mJ/cm^2 의 세기로 UVB를 조사하여 세포 손상을 유도한 다음 MTT assay로 세포 생존율을 조사하였다. 그 결과, UVB에 의해 유의한 ($p < 0.01$) 세포 사멸을 확인할 수 있었으며,

MF의 농도 의존적으로 세포 보호 효과가 나타남을 관찰하였다 (Fig. 1). 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 MF는 UVB를 처리한 세포와 비교하여 $181 \pm 8.1\%$ 의 우수한 세포생존율을 보였다. MF (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 단독 처리에서 세포 손상은 나타나지 않았다.

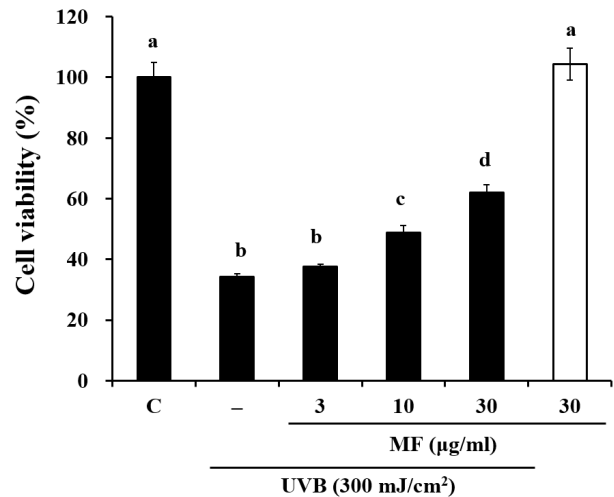


Fig. 1. Effect of MF on UVB-induced cell death in HaCaT cells. HaCaT cells were pre-treated with various concentrations (3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of MF for 18 h, exposed to UVB (300 mJ/cm^2), and cultured for an additional 5 h. Letters a-d indicate significant differences ($p < 0.05$).

2. UVB로 유도된 HaCaT cell의 세포자멸사에 MF가 미치는 효과

UVB에 의한 HaCaT 세포 손상이 세포자멸사에 기인하는지 확인하기 위해 TUNEL과 세포자멸사 관련 단백질에 대한 Western blot을 실시하였다. TUNEL 분석을 통해 UVB에 의해 유도된 세포 손상이 세포자멸사에 의해 야기되었으며, MF로 전처리하면 TUNEL 양성 세포의 수가 감소하여 세포자멸사에 의한 손상을 보호할 수 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A). 세포자멸사에 관여하는 단백질의 발현을 살펴 본 Western blot에서도 TUNEL과 같은 결과가 나타났다. UVB는 세포자멸사에 주요한 역할을 담당하는 caspase-3와 -9의 발현을 증가시켰으나 MF에 의해 감소되었다. 또한 UVB에 의해 야기된 PARP cleavage도 MF에 의해 저해되었다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 UVB에 노출된 피부각질세포에서 MF가 세포자멸사에 의한 세포 손상을 보호함을 보여준다.

3. MF가 free radical 소거에 미치는 효과

피부가 UVB에 노출되어 노화가 진행될 때 주요한 원인이 되는 것이 free radical과 같은 산화물질이다⁹⁾. MF가 이러한 free radical을 소거하는데 어떤 효과를 나타내는지 ABTS와 DPPH assay를 통해 살펴보았다. 그 결과 MF는 농도 의존적으로 free radical을 소거하는 효과를 나타내었다. MF는 2 mg/ml의 농도에서 $55.3 \pm 4.6\%$ 의 ABTS radical 저해능을 보여 50 μM 의 ascorbic acid ($55.2 \pm 3.8\%$)와 유사한 효과를 나타내었다 (Fig. 3A). DPPH radical 소거능 실험에서도 MF는

농도 의존적인 radical 소거능을 보였다. 1과 2 mg/ml의 농도에서 MF에 의한 radical 저해 효과는 각각 $28.1 \pm 1.7\%$,

$48.5 \pm 1.3\%$ 였다 (Fig. 3B).

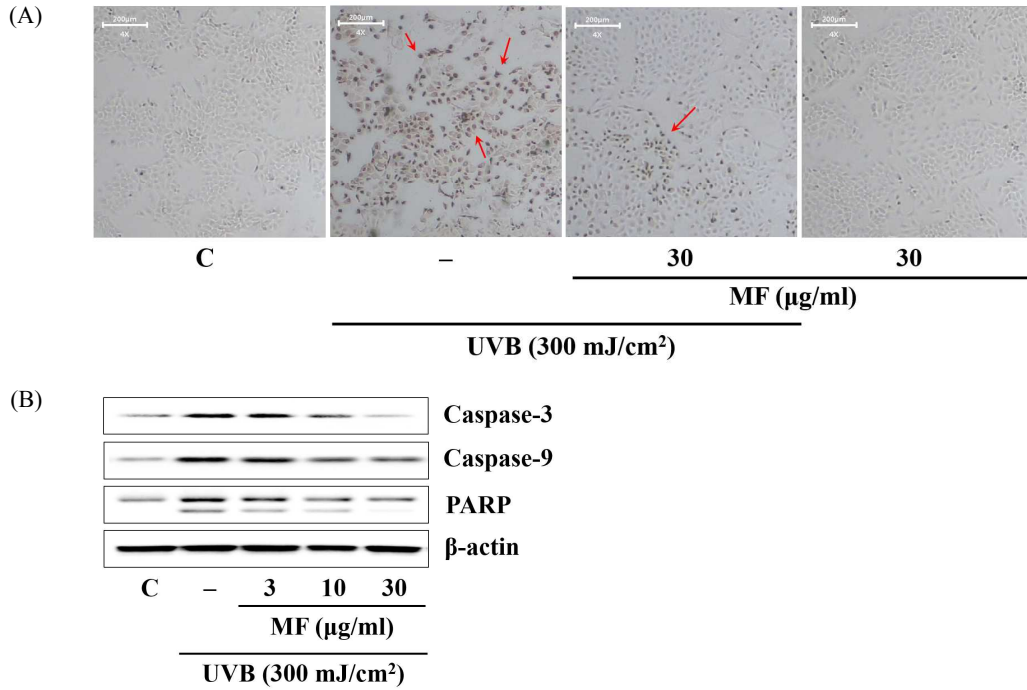


Fig. 2. Effect of MF on UVB-induced apoptosis in HaCaT cells

(A) TUNEL assay was conducted to determine apoptotic cell death. Arrows indicate TUNEL-positive cells, 4× magnification. Scale bar represents 200 µm. (B) Expression of the apoptosis marker protein was monitored by Western blot analysis, and β-actin was used as a loading control.

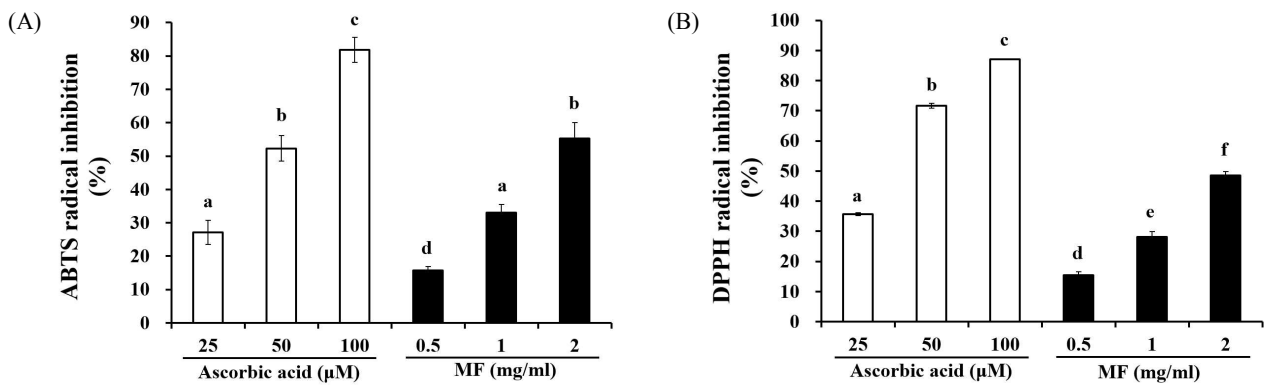


Fig. 3. Radical scavenging effect of MF

(A) ABTS radical scavenging activity and (B) DPPH radical scavenging activity in cell-free test. Ascorbic acid was used as standard antioxidant molecule. Letters a-f indicate significant differences ($p < 0.05$).

4. MF가 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과

UVB에 의한 피부 색소침착은 미용 상으로 문제가 될 뿐만 아니라 치료에 많은 시간과 경비가 소요되는 피부질환이다. 색소침착은 과도한 양의 멜라닌이 생성되기 때문이며²⁰⁾ 이 과정에서 주요한 역할을 하는 tyrosinase의 활성에 MF가 어떤 효과를 나타내는지 살펴보았다. 여러 농도(1-10 mg/ml)에서

MF는 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성을 저해하는 효과를 나타내었다 (Fig. 4). 정상적으로 기질을 첨가했을 때의 tyrosinase 활성 저해를 영점으로 하여 상대적인 효과를 살펴 본 결과, 10 mg/ml의 농도에서 MF는 $17.1 \pm 0.7\%$ 의 저해 효과를 나타내었다. 대조물질로 분석 kit에 포함된 kojic acid는 0.75 mM (≒ 106 mg/ml)의 농도에서 $60.6 \pm 1.0\%$ 의 활성 저해 효과를 보였다.

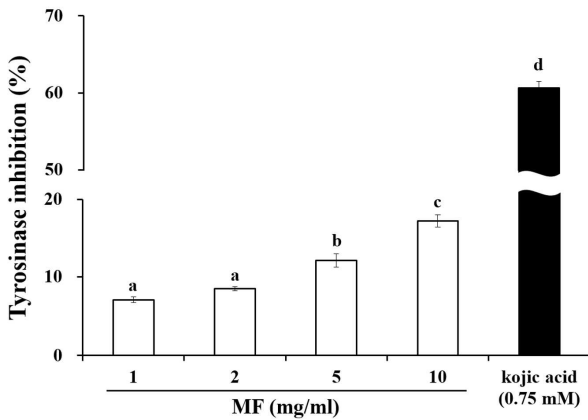


Fig. 4. Tyrosinase inhibitory effect of MF
The effect of different concentrations of MF (1-10 mg/ml) on tyrosinase activity was determined in cell-free test. Letters a-d indicate significant differences ($p < 0.05$).

IV. 고 찰

피부 건강은 산화성 유해물질, 자외선 조사, 수분 부족 등을 포함한 많은 요인에 의해 영향을 받는다²¹. 이 중에서 자외선은 피부 세포의 사멸 및 DNA 손상을 유발하며 α -MSH의 전사를 촉진하여 tyrosinase와 같은 melanin 생성 관련 유전자를 자극하여 피부 색소침착과 노화를 유도하게 된다^{22,23}. 따라서 자외선에 기인한 피부 트러블을 해결하기 위한 화장품 및 제약 제제의 개발에서 광보호 및 melanin 생성의 특성에 기초하여 항산화, 광보호 및 tyrosinase 억제 효과를 가진 후보물질들이 조사되고 있다²⁴. 특히, 본초를 포함한 천연물은 독성이 거의 없거나 무독하며 잠재적인 항산화, 항염증, 항균 활성으로 인해 관심이 높아지고 있는 후보물질이다. 본 연구에서는 소갈과 허한 체질을 개선하는데 사용되어져 온 상심자의 에탄올 추출물(MF)을 이용하여 UVB에 노출된 HaCaT 인간 각질형성세포에서 세포 보호 효과를 관찰하였고 free radical 및 tyrosinase 저해 활성을 확인하였다.

UVB는 HaCaT의 세포사멸에서 강력한 trigger로 간주될 수 있으며, DNA fragmentation, chromatin condensation, cytoplasm vacuolization과 같은 전형적인 세포사멸 양상이 나타나게 한다⁹. UVB에 의해 유도된 각질형성세포의 사멸은 주로 caspase-9의 활성화와 관련이 있는 내인성 세포사멸 경로와 관련이 있다고 보고되었다²⁵. 활성화된 caspase-9는 procaspase-3를 효소적으로 절단한 다음 C-말단의 작은 펩타이드 조각을 방출하여 caspase-3의 활성화를 유발하고 caspase-3에 의한 PARP 단백질의 절단이 손상된 DNA의 복구를 불가능하게 함으로써 최종적으로 세포사멸사를 초래한다^{26,27}. MF는 UVB에 의해 감소된 caspase-9 및 caspase-3의 발현 수준을 상향 조절하고 PARP cleavage를 저해하여 UVB로 유발된 광 손상에 대하여 항세포사멸 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 MF에 의한 TUNEL 염색 세포의 감소에서도 확인할 수 있었다.

피부의 광노화 과정에서 free radical과 같은 산화물질이

주요한 원인으로 작용한다⁹. DPPH 및 ABTS는 항산화 물질의 free radical 소거 활성을 평가하는 데 사용되는 일반적인 무세포 항산화 분석 시스템으로 유색 radical을 생성시킨 후 항산화 물질이 이를 감소시키는 능력을 조사할 수 있다²⁸. MF는 radical을 효과적으로 소거하는 항산화 활성을 나타내었는데 DPPH보다 양이온 형태의 radical을 생성하는 ABTS 분석에서 더 높은 항산화 능력을 보였다. Radical 소거능은 종종 추출물에 함유된 polyphenol과 flavonoid 화합물의 함량과 유사하게 나타난다²⁹. MF에 포함된 이 화합물들과 radical 소거능에 대한 상관관계를 알기 위해서는 성분분석 연구가 더 요구된다.

인간 피부의 색소 침착은 UVB에 반응하여 활성화된 melanocyte에서 melanin이 합성되어 발생한다^{6,7}. 멜라닌 생성은 주로 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)에 의해 유도되며 멜라닌 생성 특이적 전사 인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)와 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2와 같은 관련 효소에 의해 활성화된다³⁰. 특히, tyrosinase는 tyrosine을 levodopa (L-DOPA)로 전환하는 반응을 촉매하여 melanin 합성의 속도 제한 효소로 작용한다³¹. 뽕나무(*Morus alba* Linné)의 다양한 부위에서 tyrosinase 저해효과가 보고되었는데, 뽕나무의 나뭇가지 추출물에 의한 tyrosinase 억제효과가 확인되었고³² 뽕나무 잎 추출물과 그 성분 화합물이 tyrosinase 활성 및 melanin 생성을 저해하였다³². 본 연구에서 상심자 에탄올 추출물(MF)도 농도 의존적인 tyrosinase 활성 억제효과를 보였다. 대조물질로 사용한 kojic acid와 비교하면 다소 낮은 저해 활성을 보였는데, MF는 10 mg/ml의 농도에서 $17.1 \pm 0.7\%$, kojic acid는 0.75 mM (≈ 106 mg/ml)의 농도에서 $60.6 \pm 1.0\%$ 의 저해율을 보였기 때문에 단순 비교로 tyrosinase 저해 효과를 결정하기는 어렵다. 이상의 결과들로부터 MF는 피부 각질형성세포에서 광 손상에 의한 세포사멸사로부터 세포를 보호하고 항산화 활성 및 tyrosinase 저해 활성을 발휘하는 본초로서 전통적인 한의학활용 이외에 화장품이나 제약에서 피부 보호 소재로서의 가치가 증명되었다 할 수 있다.

V. 결 론

본 연구에서는 UVB에 노출된 HaCaT 각질형성세포에서 상심자(桑椹子) 에탄올 추출물(MF)이 나타내는 효과를 살펴 보고 항산화 및 tyrosinase 활성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. UVB에 의해 감소된 세포 생존율이 MF 전처치에 의해 유의하게 증가되었다.
2. TUNEL 염색으로 UVB에 의한 세포사멸은 세포사멸에 기인함을 확인하였으며 MF는 UVB로 유도된 세포사멸사를 억제하였다.

3. MF는 UVB에 의해 증가된 caspase-3와 -9의 발현을 감소하였고 PARP cleavage를 억제하였다.
4. MF는 ABTS 및 DPPH radical을 소거하는 활성을 보였으며, 2 mg/ml 농도에서 억제율은 각각 55.3 ± 4.6%, 48.5 ± 1.3%였다.
5. MF는 농도의존적으로 tyrosinase 활성 저해 효과를 보였다.

이러한 결과들은 UVB를 조사한 HaCaT 각질형성세포에서 MF가 세포자멸사를 억제함으로써 세포 보호 효과를 나타냄을 보여준다. 또한 UVB에 의한 산화스트레스 및 melanin 생성 등을 억제할 수 있는 가능성을 보여주는 결과로부터 MF가 자외선 지수 상승으로 인한 피부 노화와 색소침착을 방지하는데 활용될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2023년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2018R1A5A2025272).

References

1. Quam VGM, Rocklöv J, Quam MBM, Lucas RAI. Assessing Greenhouse Gas Emissions and Health Co-Benefits: A Structured Review of Lifestyle-Related Climate Change Mitigation Strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(5):468.
2. Vadrevu KP, Ohara T. Greenhouse gases, Short-Lived Climate Pollutants and aerosol pollution in South/Southeast Asia – Drivers, states and impacts. *Environ Pollut*. 2021;277:116825.
3. Murayama N, Murayama K. Data on substantial gravity of carbon dioxide due to pressured metered-dose inhaler steroid treatments for the 2006 year in Japan. *Data Brief*. 2018;20:1580-6.
4. Mohania D, Chandel S, Kumar P, Verma V, Digvijay K, Tripathi D, Choudhury K, Mitten SK, Shah D. Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. *Adv Exp Med Biol*. 2017;996:71-87.
5. Lee JW, Ratnakumar K, Hung KF, Rokunohe D, Kawasumi M. Deciphering UV-induced DNA Damage Responses to Prevent and Treat Skin Cancer. *Photochem Photobiol*. 2020;96(3):478-99.
6. Bessou S, Surlève-Bazeille JE, Sorbier E, Taïeb A. Ex vivo reconstruction of the epidermis with melanocytes and the influence of UVB. *Pigment Cell Res*. 1995;8(5):241-9.
7. Ahn HY, Choo YM, Cho YS. Anti-Pigmentation Effects of Eight *Phellinus linteus*-Fermented Traditional Crude Herbal Extracts on Brown Guinea Pigs of Ultraviolet B-Induced Hyperpigmentation. *J Microbiol Biotechnol*. 2018;28(3):375-80.
8. Kim BA. Anti-inflammation effect of extract from *Zostera marina* using UVB-induced damage on keratinocytes. *Kor J Herbol*. 2016;31(4):87-91.
9. Yoon SD, Baek WK, Kim SP, Lee KS, Cho JW. Induction of Apoptosis and Autophagy in UVB-Treated HaCaT Cells. *Korean J Dermatol*. 2013;51(8):600-7.
10. Lee SI. *Herbology*. Seoul: Uiyag-sa. 1981:135.
11. Park YKK, Kang BS. Antioxidation Effects of *Mori Fructus* in vitro. *Kor J Herbol*. 1999;14(2):43-50.
12. Choi SJ, Choi J, Lee CU, Yoon SH, Bae SK, Chin YW, Kim J, Yoon KD. Rapid separation of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside from crude mulberry extract using high-performance countercurrent chromatography and establishment of a volumetric scale-up process. *J Sep Sci*. 2015;38(11):1828-36.
13. Kim EO, Lee YJ, Leem HH, Seo IH, Yu MH, Kang DH, Choi SW. Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberry from seven different *Morus alba* L. cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2010;39(1):1467-75.
14. Kim YR, Kim AJ. Evaluation of the Biological Activities of Berries as an Inner Beauty Ingredient. *Asian J Beauty Cosmetol*. 2020;18(3): 375-87.
15. Park SJ, Jeong JC. ROS-, RNS-Scavenging and Anti-inflammatory Activities of *Mori Fructus*. *J Korean Oriental Med*. 2008;29(1):106-16.
16. Lee SJ, Chpi HR, Lee JC, Park HJ, Lee HK, Jeong JT, Lee TB. The Anti-aging Effects of Various Berries in the Human Skin Keratinocyte (HaCaT) Cells. *Korean J Food Sci Technol*. 2014;46(2): 198-204.
17. Hwang KH. Anti-stress and Promoting Effect of the Fruit of *Morus alba*. *Korean J Food Sci Technol*. 2005;37(1):95-102.
18. Lee SH, Kim GH. Inhibitory effect of mulberry extracts on angiogenesis in porcine artery endothelial cells. *J Life Sci*. 2008;18(5):653-9.
19. Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS, Moon JY. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *J Seric Entomol Sci*. 1996;38(2):

- 100-7.
20. Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017;32(1):403-25.
 21. Amaro-Ortiz A, Yan B, D'Orazio JA. Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules*. 2014;19(5):6202-19.
 22. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016 Jul 15;17(7):1144.
 23. Yardman-Frank JM, Fisher DE. Skin pigmentation and its control: From ultraviolet radiation to stem cells. *Exp Dermatol*. 2021;30(4):560-71.
 24. Zaid AN, Al Ramahi R. Depigmentation and Anti-aging Treatment by Natural Molecules. *Curr Pharm Des*. 2019;25(20):2292-312.
 25. Lee CH, Wu SB, Hong CH, Yu HS, Wei YH. Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *Int J Mol Sci*. 2013;14:6414-35.
 26. Park SJ. Protective effect of *Caryophylli Flos* on apoptosis caused by oxidative stress in HaCaT cells. *Kor J Herbol*. 2011;36(5):93-9.
 27. Devin A, Lin Y, Liu ZG. The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO Rep*. 2003;4(6):623-7.
 28. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):3380.
 29. Shalaby EA, Shanab MM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J Geo-Marine Sciences*. 2013;42(5):556-64.
 30. Jin ML, Park SY, Kim YH, Park G, Son HJ, Lee SJ. Suppression of α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by cordycepin via inhibition of CREB and MITF, and activation of PI3K/Akt and ERK-dependent mechanisms. *Int J Mol Med*. 2012;29(1):119-24.
 31. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(9):1493-506.
 32. Zhang L, Tao G, Chen J, Zheng ZP. Characterization of a New Flavone and Tyrosinase Inhibition Constituents from the Twigs of *Morus alba* L. *Molecules*. 2016;21(9):1130.
 33. Lee SH, Choi SY, Kim H, Hwang JS, Lee BG, Gao JJ, Kim SY. Mulberroside F Isolated from the Leaves of *Morus alba* Inhibits Melanin Biosynthesis. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(8):1045-8.