대한기초간호자연과학회지
Vol.3, No.1, July 2001

주요개념 : 항산화효소, 자외선조사
BALB/c마우스

UVB 1회 조사 후 시간에 따른 BALB/c마우스의 피부 항산화효소 활성도 변화

이정희,[1] 박경애,[2] 이희주,[1] 박명숙,[1] 전상은,[1] 박경찬,[3] 최스미[1]

- Abstract -

Key concept : catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase, BALB/c mouse, UVB irradiation

Temporal changes of the activity of catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase in BALB/c mice skin after a single dose UVB irradiation

Lee Joung Hee,[1] Park Kyoung Ae,[2] Lee Hee Joo,[1] Park Myoung Sook,[1] Jeon Sang Eun,[1] Park Kyoung Chan[3] and Choi Smi[1]

Skin is constantly exposed to air, solar radiation, ozone and other air pollutants formulating free radicals. The reactive oxygen species(ROS), formed under these conditions, are associated with skin cancers, cutaneous photoaging, and cutaneous inflammatory disorders. In this study, we sought to establish an animal model for UVB-induced skin alteration using BALB/c mice. The level of UVB irradiation used in this model was within physiological dose.

BALB/c mice were exposed to a single dose of UVB (200mJ/㎠) and were sacrificed at 3, 6, 24, and 48 hours following the irradiation. The effect of a single exposure to UVB irradiation on skin catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD), and glutathione peroxidase (GPx) activities were examined.

Significant decrease in the activity of all enzymes were observed at 6 hours after irradiation($p<.05$). The activity of CAT decreased more sharply than those of SOD and GPx, and then remained depressed until 48 hours after UVB irradiation, whereas the activity of GPx recovered to basal level at 48 h after UVB irradiation.

Our results indicate that BALB/c mouse could be an adequate animal model of UVB irradiation experiment. These results will also provide fundamental knowledge for the effective nursing strategies in reducing UV-induced skin disorders.

1) College of Nursing, Seoul National University
2) School of Human Ecology, KaYa University
3) Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine Corresponding author: 최스미

서 론

인체에 해로운 영향을 끼치는 자외선은 태양광선 중 방사량이 5%에 불과하나 에너지를 갖는 광선으로서 부딪히는 물체의 분자를 활성화시켜 광화학반응을 유발하게 된다(Pathak, & Stratton, 1968). 파장이 290nm 이하의 자외선 C(UVC)는 지구의 오존층에 의해 차단되어 지표면에는 도달하지 않으며, 290~320㎚의 자외선 B(UVB)와 320~400㎚의 자외선 A(UVA)가 인체에 영향을 끼치는 것으로 보고되었다(김봉인, 장문정, 김명숙, 류지원, 김조용, 1999). 자외선 A는 피부 노화, 자외선 B는 일광 화상, 자외선 C는 피부암 발생과 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(Gilochrest, 1995).

최근 대기오염으로 인해 자외선을 흡수해 주는 오존층이 파괴되면서 자외선으로 인한 피부문제가 급증하고 있다. 오존량 1% 감소시 자외선 방사량이 2~4%증가되며 자외선 방사량 1% 증가시에는 피부암 발생률이 2~5% 증가된다(김봉인 등, 1999). 오존층 파괴에 가장 민감하게 증가하는 UVB는 인체 피부 홍반을 일으키고 발암(photocarcinogenesis), 면역 기능 저하, 백내장을 유발하는 것으로 밝혀졌다(Gilochrest, 1995). 자외선으로 인한 피부의 산화적 손상으로 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 관여되는데, 그 결과 세포의 정상기능에 이상을 초래되고 염증, 발암 등의 병적 상태와 피부노화 등의 퇴행성 변화가 일어난다(Darr, & Fridovich 1994, Fuchs, & Packer, 1995). 이러한 조직손상의 기전은 지질 또는 단백질에 과산화(peroxidation)를 일으켜 세포막 기능의 이상을 가져오고, 여러 효소의 기능을 불활성화시키거나 단백질 변성을 유도하고, DNA에 손상을 주어 암을 비롯한 여러 질환을 유발하는 것으로 설명된다(Miyachi, Imamura, Niwa, Tokura, & Takigawa 1986, Cross, et al., 1987). 이러한 산화적 스트레스에 대하여 피부는 다양한 방어기전을 보유하고 있는데, 항산화 방어체계는 효소계로서 SOD(superoxide dismutase), CAT (catalase), GPx(glutathione peroxidase), GR (glutathione reductase)등이 있으며 비효소계로써 항산화제 혹은 free radical scavenger 역할을 하는 것으로 tocopherols, β-carotenes, ascorbic acid 및 glutathione 등이 알려져 있다(Pugliese, 1998).

보고된 바에 의하면 자외선을 조사하면 피부 항산화기전에 변화가 있는 것으로 알려져 있으나 실험마다 1회 조사량이 5J/㎠에서 25J/㎠으로 다양하였다. 조사량 25J/㎠은 38° N의 가을 햇볕에 4~5시간 동안 노출되는 양과 같아서(Shindo et al., 1994) 인체가 일상생활에서 순간 조사되는 양과는 큰 차이가 있다. 따라서 자외선 1회 조사량을 일상생활 수준으로 하는 연구가 요구된다.

또한 자외선 조사 실험의 대부분이 hairless 마우스를 대상으로 하였기 때문에 다른 실험동물의 피부 항산화효소 활성도나 자외선 조사 후 항산화기전에 대한 연구는 미비하여 실험동물간의 항산화기전의 차이를 비교할 수 없었다. BALB/c 마우스는 실험 동물 수급이 원활하고 실험 동물로 취급이 용이하여 다른 분야의 실험에 광범위하게 사용되고 있으므로, 피부과학적 결과만이 아니라 연계된 다른 결과를 얻어낼 수 있는 장점이 있다. Miyachi, Imamura, & Niwa(1987)의 연구에서는 BALB/c마우스를 대상으로 피부 항산화효소 중 SOD 활성도 변화만을 살펴본 것에 그쳐 자외선 조사에 의한 BALB/c마우스의 전반적인 피부 항산화효소계의 변화를 파악할 수 없었다.

본 실험은 UVB 조사 동물모델을 BALB/c마우스를 통해 확립하고, 조사량을 생리학적 수준으로 하여 피부 항산화 효소 활성도의 시간에 따른 변화를 조사하기 위해 계획되었다. 동물 실험을 통해 자외선 조사로 유발되는 산화적 스트레스에 대한 피부의 정상 방어체계 변화의 기전을 명확히 밝힌다면, 일상생활 동안 노출되는 자외선에 의한 인체 피부손상 기전도 유추된다. 최근 간호학의 중요한 주제가 건강유지, 증진으로 옮겨가는 시점

에서 자외선에 의한 피부암, 일광화상, 피부노화를 예방하기 위한 간호전략 개발이 절실히 요구되는데, 본 연구는 이에 대한 기초자료를 제공하기 위하여 시행되었다.

연구 방법

1. 실험동물

대한실험동물센타에서 생후 8주령의 수컷 BALB/c마우스 24마리를 공급받아 사용하였다.

2. UVB조사

마우스의 등 부위 털을 제모제(니트크림, 일동제약)와 제모기를 이용하여 제거하고 24시간 경과 후 Ketamine 100㎎/㎏을 복강내 주입하여 마취시키고 고정틀을 이용하여 고정하였다. 마우스의 등 부위에 BLE-1T158 lamp(Spectronics Corporation, Westbury, N.Y.)를 이용하여 UVB(290-320㎚)를 조사량 200mJ/㎠으로 1회 조사하였다. 조사량 200mJ/㎠은 본 연구팀의 예비실험을 통해 피부 항산화효소 활성도의 변화를 일으키는 최소한의 UVB 양이었다. UVB 조사시 마우스 고정틀은 램프와 30㎝ 떨어진 지점에 고정하였으며 1회 5마리씩 조사하고 조사 전후 Waldmann UV meter (model No. 585100 ; Waldmann Company, VS-Schwenningen, Germany)를 이용하여 calibration 하였다(30㎝ 지점에서 0.81±0.02 ㎽/㎠).

3. 피부조직 준비

조사 후 3시간, 6시간, 24시간, 48시간에 각각 5마리의 마우스를 경추탈골로 희생시킨 후 등 부위 피부를 절제하였다. 절제된 피부조직은 1% phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하여 혈액을 제거하고 액화 질소로 급속 냉동시켰다. 동결조직을 알루미늄 포켓에 넣어 동결상태로 망치로 잘게 부수어 Buffer A(130mM sodium chloride, Glucose 5mM, EDTA 1mM, sodium phosphate buffer(pH 7.5, 10mM)로 희석한 후 bead를 넣고 vortex하여 단백질을 추출하였다. 대조군으로 UVB를 조사하지 않은 8주령의 BALB/c마우스를 같은 방법으로 피부 조직을 준비하였다.

4. 피부 항산화효소 활성도 측정

(1) Catalase(CAT) 활성도

CAT 활성도는 Aebi(1984)의 방법에 의해 피부 단백질 추출액 10,000×g 부유층에 H_2O_2를 첨가한 후 240㎚에서 흡광도 감소를 측정하였다. H_2O_2의 분자흡광계수인 $43.6M^{-1}cm^{-1}$을 이용하여 활성도를 계산하였다.

(2) Superoxide dismutase(SOD) 활성도

SOD 활성도는 피부 단백질 추출액의 10,000×g 부유층을 채취하여 480㎚에서 흡광도 감소를 측정하였다(Misura, & Fridivich, 1972). Epinephrine의 자동 산화물질인 adrenochrome의 축적을 50% 저해하는 데 필요한 SOD의 양을 1unit로 하여 활성도를 계산하였다.

(3) Glutathione peroxidase(GPx) 활성도

GPx 활성도는 피부 단백질 추출액의 10,000×g 부유층에서 cumene hydroperoxide를 기질로 사용하여 측정하였다. NADPH가 $NADP^+$로 산화되는 정도를 340㎚에서 분광광도계로 측정하였고, NADPH의 분자흡광계수인 $6.22mM^{-1}cm^{-1}$을 이용하여 활성도를 계산하였다(Tappel, 1978).

5. 단백질 함량 측정

피부 단백질 추출액 10,000×g 부유층의 단백질 함량은 Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall(1951)의 방법에 의해 750㎚에서 분광광도계로 측정하였고, bovine serum albumin 용액을 표준용액으로 사용하여 단백질 함량을 계산하였다.

6. 자료분석 방법

실험결과는 SAS 통계 program을 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차를 계산하였고 $p < .05$ 수준에서 비모수 student's paired t-test에 의하여 각 실험군간의 유의차를 검증하였고 모든 실험 결과간의 상관관계를 알아보았다.

연구결과

1. CAT 활성도

CAT 활성도는 자외선 조사 3시간 후 조사 전 기준값(14.03 unit/㎎ protein)보다 유의하게 감소하였고($p<.05$), 6시간 후에는 기준값의 73%(=10.50 unit/㎎ protein)로 최저값을 나타냈다($p<.05$)(Fig.4). 감소된 CAT활성도는 조사 후 48시간까지 기준값으로 회복되지 않았다(Fig.1).

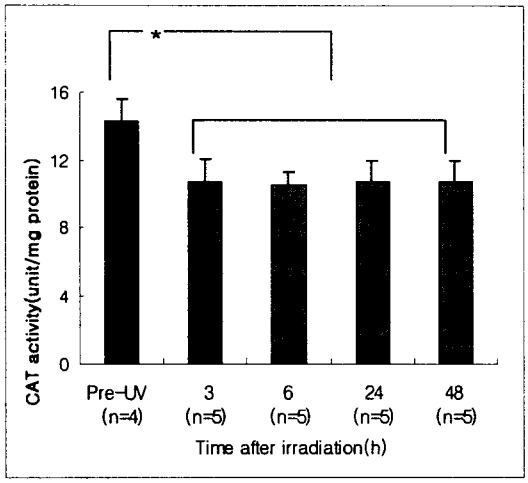

Fig.1. The effects of UVB irradiation on murine skin CAT activity(unit/ mg protein) at 3, 6, 24, 48 h after irradiation.
: results are mean ±SD
SDs are represented by horizontal bars.
* : significant difference in CAT activity compared to that of before irradiation($p < .05$)

2. SOD활성도

SOD 활성도는 조사 후 3시간부터 감소하기 시작하였으며 6시간 후 조사 전 기준값(=16.40 unit/㎎ protein)에 비해 유의하게 감소하였다($p < .05$)(Fig.2). SOD 활성도는 24시간 후부터 48시간까지 증가하는 경향을 보였으나 유의하지 않았다(Fig.4). 조사 24시간, 48시간 후 SOD 활성도는 6시간 후 활성도와 유의한 차이가 없었다.

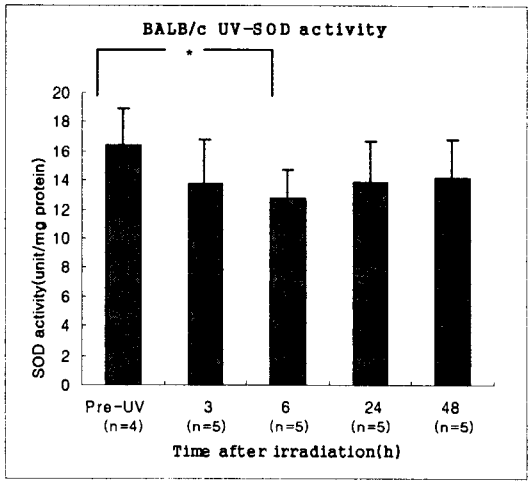

Fig.2. The effects of UVB irradiation on murine skin SOD activity(unit/ mg protein) at 3, 6, 24, 48 h after UVB irradiation.
: results are mean ±SD
SDs are represented by horizontal bars.
* : significant difference in SOD activity from that of before irradiation ($p < .05$)

3. GPx활성도

자외선 조사 후 GPx 활성도는 3시간 후부터 감소하여 조사 6시간 후 기준값(=0.0435 unit/㎎ protein)의 76%(=0.035 unit/㎎ protein)로 기준값에 비해 유의하게 감소하였다($p<.05$)(Fig.3, Fig.4). GPx 활성도는 자외선 조사 24시간 후부터 증가하여 48시간 후에는 최저값인 조사 6시간 후의 활성도에 비해 유의하게 회복되었으며($p<.05$), 기본값

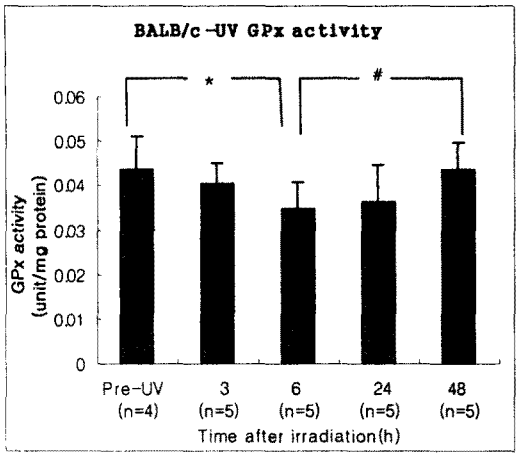

Fig.3. The effects of UVB irradiation on murine skin GPx activity(unit/mg protein) at 3, 6, 24, 48 h after UVB irradiation.
SDs are represented by horizontal bars.
* : significant difference in GPx activity from that of before irradiation($p< .05$)
# : significant difference in GPx activity from that of 6 h after irradiation($p< .05$)

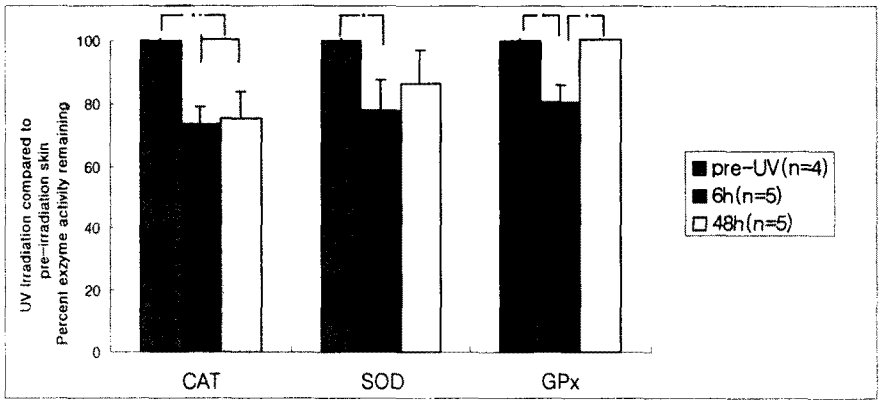

Fig.4. Changes in skin antioxidant enzyme activities in response to UVB irradiation
: results are mean(% of pre-irradiation cutaneous enzyme activity) ±SD; * $p< .05$

Table 1. Cutaneous CAT, SOD, and GPx activities in BALB/c mice follwing UVB-irradiation*

Hours after irradiation	Catalase activity	SOD activity	GPx activity
pre irradiation (n=4)	14.31 ± 1.28^{a}	16.41 ± 2.51^{b}	0.044 ± 0.008^{c}
3 (n=5)	10.66 ± 1.34^{a}	13.70 ± 3.03	0.041 ± 0.005
6 (n=5)	10.50 ± 0.82^{a}	12.87 ± 1.90^{b}	$0.035\pm0.006c^{e}$
24 (n=5)	10.74 ± 1.25^{a}	13.87 ± 2.84	0.036 ± 0.009
48 (n=5)	11.21 ± 0.78^{a}	14.15 ± 2.59	0.044 ± 0.006^{e}

* Data represent mean±SD of four or five experiments.
The average value of each experiment arises from four determinations; unit/mg protein
a : significant difference in CAT activity compared to that of before irradiation($p< .05$)
b : significant difference in SOD activity from that of before irradiation($p< .05$)
c : significant difference in GPx activity from that of before irradiation($p< .05$)
e : significant difference in GPx activity from that of 6 h after irradiation($p< .05$)

과 유의한 차이가 없었다.

논 의

본 연구에서는 BALB/c마우스를 이용하여 UVB 를 1회 조사한 후 시간에 따른 피부조직의 항산화 효소 활성도 변화를 측정하였다. 자외선 조사 전 CAT, SOD 및 GPx의 활성도는 hairless 마우스에서 측정한 활성도(Shindo, Witt, & Packer, 1993)와 비교하여 각각 50%, 80%, 96% 수준이었다. 본 연구에서 측정된 BALB/c마우스의 피부 항산화효소 활성도는 hairless마우스의 활성도와 차이가 있음을 알 수 있다. 이는 실험동물의 선택에 따라 피부 항산화 효소 활성도의 정상범위에 차이가 있을 수 있음을 시사한다.

한편, UVB 조사량 200mJ/㎠을 이용하여 피부 항산화효소 활성도 변화를 관찰한 결과 BALB/c 마우스의 피부 CAT 활성도는 자외선 조사 후 3시간에서 조사 전과 비교하여 유의하게 감소하였으나, SOD와 GPx 활성도 감소는 조사 후 6시간에서 유의하게 감소하여 지연되어 나타났다. 이는 CAT 활성도가 다른 피부 항산화효소에 비하여 UVB 조사에 민감하다는 Fuchs 등(1989)의 결과와 일치한다. CAT는 피부에서 H_2O_2를 제거하는 효소로서 자외선 조사를 받으면 산화적 손상을 받아 효소의 활성도가 급격히 감소한다(Kohen, 1999). hairless마우스 표피에서는 조사 전 활성도의 12%, 진피에서는 28%까지 감소되어 다른 항산화 효소보다 현저한 감소를 보였으나(Shindo, Witt, & Packer, 1993), BALB/c마우스에서는 조사 전 기준값의 73%로 감소폭이 좁았다. 이는 동물종에 따라 피부 각질층의 두께의 차이와 자외선 조사량의 차이에서 기인하는 것으로 생각된다.

CAT 또는 GPx는 모두 H_2O_2를 제거하는 효소이나, GPx는 피부내 H_2O_2 농도가 낮을 때 활성화되는 반면, CAT는 H_2O_2 농도가 높을 때 강력한 작용을 한다(Pugliese, 1998). 자외선 조사 후 감소되었던 CAT 활성도가 다른 효소와 달리 48시간 후까지도 회복되지 않았던 본 연구결과도 CAT가 자외선에 의해 가장 큰 영향을 받는 효소임을 시사한다. 반면 SOD 활성도는 자외선 조사 6시간 후 최저값으로 감소하였다가 24시간부터 다시 증가하여 48시간 후 회복되는 양상을 보였는데 이는 UVB조사량을 90mJ/㎠하였을 때 조사 후 12시간까지는 변화가 없다가 48시간 이후부터 유의하게 감소되었다(Pence, & Naylor 1990)는 연구결과와 상반된다. 이는 실험동물이 다른 이유도 있겠으나 조사량이 본 실험(200mJ/㎠)보다 적었기 때문에 항산화효소 활성도의 감소가 지연되어 나타났을 것으로 유추된다. Miyachi, Imamura, & Niwa(1987)는 본 실험의 5배에 해당하는 조사량 1J/㎠으로 같은 실험동물인 BALB/c마우스의 피부 SOD 활성도가 자외선 조사 3시간 후부터 감소되기 시작하여 24시간 후에 최대로 감소하였다가 72시간 후에 기준값으로 회복된다고 밝혔다. 이처럼 SOD 활성도의 감소가 자외선 조사 24시간 후까지 지속된 것은 조사량에 비례하여 산화적 손상이 컸고 이에 따라 과다 생성된 ROS를 제거하기 위해 SOD의 소비가 증가하면서 초래된 것으로 사료된다. 이러한 가정은 자외선 조사량이 작은 경우(<5J/㎠)에는 피부 표피층의 구조변화 없이 피부 표피층 항산화기전의 변화만을 일으키지만 조사량이 큰 경우에는 전체 피부조직의 변화를 일으킨다는 Shindo 등(1994)의 주장과 같은 견해이다.

본 실험에서 GPx 활성도는 CAT나 SOD 활성도와 달리 조사 후 48시간에 자외선 조사 전 활성도 수준으로 증가되어 자외선 조사 후 가장 빠른 회복을 보였다. 이같은 결과는 피부의 H_2O_2와 지질과산화물을 제거하는 효소인 GPx 활성도는 자외선 조사에 의해 별로 영향을 받지 않는다(정진호, 2001)는 주장과 같다. 다만, 실험에서 자외선 조사 6시간 후 GPx 활성도가 유의하게 감소되었는데, 이는 실험동물인 BALB/c마우스의 피부 항산화기전이 hairless마우스와 차이점으로 사료된다. GPx 활성도는 selenium과 glutathione(GSH)농도에 의해 결정되는데, 피부의 GSH 양은 표피와 진피 모두에서 간 조직에서와 같은 높은 수준인

것으로 알려져 있다(Fuchs, & Packer, 1995). Wheeler, Asward, Connor, & Lowe(1986)는 UVA를 5J/㎠ 조사한 hairless마우스에서 항산화제인 GSH 농도가 조사 후 24~48시간까지도 감소되지 않고 유지되는 것을 관찰하였다. 그러므로 glutathione계 항산화효소인 GPx의 활성도가 자외선 조사시에도 활성도를 유지하기 때문에 산화적 손상으로 과다 소비된 다른 피부 항산화효소의 활성도가 감소된 상태에서도 항산화 방어기전을 수행하는 중요한 효소라고 사료된다. 앞으로 자외선과 관련된 피부의 산화적 손상을 감소시키기 위한 전략을 개발하기 위해서는 GPx의 이러한 특성을 충분히 활용할 필요가 있다.

본 실험에서는 생리학적 수준인 200mJ/㎠을 조사하여 피부 항산화 방어기전의 변화를 살펴보았다. 8주령 black마우스에 본 실험과 같은 양인 UVB 200mJ/㎠를 1회 조사한 후 항산화효소의 변화를 측정하였을 때 CAT, SOD 및 GPx 활성도는 4시간에서 최대로 떨어졌다가 24시간 정도에서 최대로 올라간 후, 72시간에서 처음과 같은 수준으로 돌아가며, 1주일 후 처음보다 높아졌다고 보고되었다(Iizawa, Kato, Tagami, Akamatsu, & Niwa, 1994). 본 실험에서도 세 가지 효소의 활성도가 모두 자외선 조사 후 3시간부터 감소하기 시작하여 24시간 이후부터 증가하는 같은 양상을 보였다. 같은 조사량에도 불구하고 본 실험에서 조사 24시간 이후 CAT, SOD 활성도가 조사 전 기준값 수준으로 회복되지 않은 것은 실험동물 종을 달리하였고 생체내 호르몬의 변화를 피하기 위해 본 실험에서는 수컷을 이용한 점, 자외선 조사 전 제모 방법의 차이에 기인한 것으로 사료된다.

본 실험을 통하여 자외선 실험동물 모델로 확립된 BALB/c마우스는 이제까지 사용하던 hairless 마우스보다 구입이 쉽고 취급이 용이하여 자외선 조사 실험을 현재보다 다방면으로 활발하게 진행시킬 수 있는 동물이다. 그리고 연구에서 사용된 자외선 조사량 200mJ/㎠도 결과적으로 피부 항산화효소 활성도의 변화를 일으키는 생리학적 수준의 양임이 입증되었다. 본 연구 결과는 차후 자외선 조사 후 피부의 산화적 손상을 감소시키는 항산화 기능성 식품과 피부 항산화 기전에 관한 연구의 초석이 되며 피부문제를 예방하는 건강증진 전략을 수립하고 피부 손상 대상자를 위한 간호과정을 수행하는 데 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

제 언

본 연구에서는 BALB/c마우스를 이용하여 자외선 조사에 따른 항산화효소 활성도만을 살펴보았으나 조사량 200mJ/㎠ single dose에서 피부 세포 변화를 관찰하는 조직학적 접근도 필요하겠다. 또한, BALB/c마우스를 대상으로 자외선 조사 48시간 이후의 항산화효소 활성도 변화를 장기간 관찰하여 BALB/c 모델에서 피부 항산화효소가 조사 전 기본값으로 회복되는 시점도 밝혀야 한다. 한편, hairless마우스와는 달리 털이 있는 자외선 동물 모델을 구축하기 위해서는 제모법을 표준화할 필요가 있다.

참고문헌

김봉인, 장문정, 김명숙, 류지원, 김조용(1999). 피부과학. 서울: 형설출판사.

이은옥, 임난영, 박현애(1998). 간호·의료연구와 통계분석. 서울: 수문사.

정진호(2001). 피부 항산화 방어 기전. 대한피부과학회지, pp.75-79(미출간 원고임).

Aebi, H.(1984) Catalase in Vitro. In, Methods in enzymology. New York, Academic Press. pp.121-127.

Cross, C. C., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., McCord, J. M.,& Harman, D.(1987). Davis conference: oxygen radicals and human disease. Annual Internal Medicine, 107, 526-545.

Darr, D. & Fridovich, I.(1994). Free radicals on cutaneous biology. Journal of Investigative Dermatology, 120, 671-675.

Fuchs, J., Huflejt, M. E., Routhfuss, L. M. Wilson, D. S., Carcamo, G., & Packer, L.(1989). Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. Journal of Investigative Dermatology, 93, 769-773.

Fuchs, J., & Packer, L.(1995). Oxidative Stress in Dermatology. Marcel Dekker, Inc.

Gilochrest, B. A.(1995). Photodamage. New York: Blackwell Science.

Iizawa, O., Kato, T. Tagami, H., Akamatsu, H., & Niwa, Y.(1994). Long-term follow-up study of changes in lipid peroxide levels and the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase on mouse skin after acute and chronic UV irradiation. Archives of Dermatological Research, 286, 47-52.

Kohen, R.(1999). Skin antioxidants : their role in aging and in oxidative stress New approaches for their evaluation. Biomed & Pharmacotherapy, 53, 181-92.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. T.(1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.

Misura, H., & Fridovich, I.(1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. Journal of Biological Chemistry, 247(10), 3170-3175.

Miyachi, Y., Imamura, S., Niwa, Y., Tokura, Y., & Takigawa, M.(1986). Mechanisms of contact photosensitivity in mice. VI. Oxygen intermediates are involves in contact photosensitization, but not in ordinary contacts sensitization. Investigative Dermatology, 86, 26-28.

Miyachi, Y., Imamura, S., & Niwa, Y.(1987). Decreasedskin superoxide dismutase activity by a single exposure of ultraviolet radiation is reduced by liposomal superoxide dismutase pretreatment. Journal of Investigative Dermatology, 89, 111-112.

Pathak, M. A., & Stratton, K.(1968). Free radicals in human skin before and after exposure to light. Archives of Biochemistry and Biophysics, 123, 468-476.

Pence, B. C., & Naylor, M. F.(1990). Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in hairless mice. Journal of Investigative Dermatology, 95, 213-216.

Pugliese, P. T.(1998). The skin's antioxidant systems. Dermatology Nursing, 10(6), 401-406.

Shindo, Y., Witt, E., & Packer, L.(1993). Antioxidant defense-mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. Journal of Investigative Dermatology, 100, 260-265.

Shindo, Y., Witt, E., Han, D., & Packer, L.(1994). Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. Journal of Investigative Dermatology, 102, 470-475.

Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Tzeng, B., Nguyen, L., & Packer, L.(1994). Recovery of antioxidants and reduction in lipid hydroperoxides in murine epidermis and dermis after acute ultraviolet radiation exposure. Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine, 10, 183-191.

Tappel, A. L.(1978). Glutathione peroxidase and hydroperoxides. In Methods in Enzymology. New York: Academic Press.

Wheeler, L. A., Asward, A., Connor, M. J., & Lowe, N.(1986). Depletion of cutaneous glutathione and the induction of inflammation by 8-methoxypsoralen plus UVB radiation. Journal of Investigative Dermatology, 87, 658-662.