

## 권백 추출물의 인간 피부 섬유아세포에서의 항산화와 Matrix Metalloproteinase-1 발현저해효과

심관섭<sup>#</sup> · 김진화 · 박성민 · 이범천 · 윤여표\* · Yong He Zhang\*\* · 표형배

한불화장품 기술연구소, \*충북대학교 약학대학, \*\*Department of Pharmacology, Peking University

(Received April 2, 2004; Revised April 15, 2004)

### Effect of the *Selaginella tamariscina* Extract on Antioxidation and Inhibition of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Skin Fibroblasts

Gwan Sub Sim<sup>#</sup>, Jin Hwa Kim, Sung Min Park, Bum Chun Lee, Yeo Pyo Yun\*, Yong He Zhang\*\* and Hyeong Bae Pyo

Hanbul Cosmetics, R&D Center 72-7, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-830, Korea

\*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

\*\*Department Of Pharmacology, Peking University, School of Basic Medical Science, 38 Xueyuan Road, Beijing 100083, China

**Abstract** — The production of matrix metalloproteinases (MMPs) by the UV irradiated skin fibroblast and the degradation of extracellular matrix (ECM) by these enzymes is known as one of the main reasons of photoaging. In this paper, to investigate the relationship between aging and *Selaginella tamariscina* extract (STE), we investigated the effects of antioxidant and expression of UVA-induced MMP-1 in human dermal fibroblasts. STE was found to show scavenging activities of radicals and reactive oxygen species (ROS) with the IC<sub>50</sub> values of 65.1 µg/ml against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical and 40.9 µg/ml against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. UVA induced MMP expression was reduced 75.5% by treatment with STE, and MMP-1 mRNA expression was reduced in a dose-dependent manner. Therefore STE was able to significantly inhibition of MMP expression in protein and mRNA level. All these results suggested that STE may act as an anti-aging agent by antioxidation and reducing UVA-induced MMP-1 production.

**Keywords** □ *Selaginella tamariscina*, antioxidant, MMP

피부의 노화는 시간의 흐름에 따라 생리적 노화(chronological aging)과정과 외재적 요인에 의한 노화(extrinsic aging)과정으로 나누어 진다.<sup>1)</sup> 피부노화에 영향을 미치는 외부인자들은 바람, 온도, 습도, 담배연기, 공해, 자외선 등에 의해서 노화가 일어나며 특히 자외선에 의한 노화를 광노화 라고 한다. 자외선은 유해한 활성화 산소를 많이 만들어내고, 피부 세포에서 유전자 돌연변이를 유발할 뿐만 아니라, 신호 전달 체계나, 세포주기, 또는 암 유발 등에 관련된 유전자들의 발현을 변화시킨다. 따라서 ROS로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험은 증가하고 있다.<sup>2-5)</sup> 만성적 일광 손상을 입은 피부에서 볼 수 있는 현상은 진피의 상부쪽 교원질의 비정상적인 elastotic material의 침착(solar elastosis)<sup>6)</sup>과 proteoglycan이 증가되고 진피의 주 단백질인 콜라

겐이 현저히 감소되는 것이다.<sup>7)</sup> 일반적으로 진피층은 대다수의 type I collagen과 약간의 type III collagen, elastin, proteoglycan, fibronectin 등으로 구성되어 있다.<sup>8)</sup> 또한 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 부여하며 이로 인해 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층의 90%를 차지하고 있어 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다.<sup>9)</sup>

MMP(matrix metalloproteinase)는 ECM(extracellular matrix, 세포외기질)과 BM(basement membrane, 기저막)의 분해에 관여하는 여러 효소의 family로 구조와 기능적 특성에 따라 interstitial collagenase, stromelysin, gelatinase, membrane-type MMP(MT-MMP) 등 네개의 subfamily로 나누어 진다.<sup>10)</sup> MMP는 활성중심부에 아연을 가지는 금속단백분해효소로 생체 내에서 잠재성 전효소(zymogen)형태로 분비된다. 효소활성을 가지기 위해서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단, 활성화 되며 활성화된 MMP는  $\alpha$ 2-macroglobulin이나 TIMPs

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 043-879-2282 (팩스) 043-881-2128  
(E-mail) gssim@hanbul.co.kr

(tissue inhibitors of metalloproteinase) 같은 저해제에 의해 활성이 조절되고 피부의 keratinocyte, fibroblast를 포함한 대다수의 많은 세포들이 MMP를 분비한다.<sup>11)</sup> Fisher 등은 1회의 UV 조사에도 피부내의 MMP 활성이 증가되며 피부내 콜라겐을 현저하게 붕괴 시킴으로써 MMP들이 진피층의 콜라겐 붕괴에 영향을 미치며 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다.<sup>12)</sup>

생약제인 권백(*Selaginella tamariscina*)은 일명 부처손이라고 불리우는 부처손과에 속하는 다년생 초본으로 파혈(破血)작용이 있어 월경폐지, 타박상, 복통, 천식 치료에 효능이 있고 지혈(止血)작용이 있어 혈변, 혈뇨, 탈항 치료에 사용하였으며, 간암, 폐암, 모발상피암 같은 종양에 탁월한 효과를 나타내는 생약으로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 그러나, 권백추출물의 피부 노화에 대한 생리활성기능적 접근이나 연구결과는 거의 전무하였다.

본 연구는 권백추출물의 항산화 효과 및 UVA에 의한 human dermal fibroblast에서 MMP-1 생성 억제 효과를 검색하여 항산화 소재로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

## 실험방법

### 시료의 추출

본 실험에서 사용한 권백은 *Selaginella tamariscina*로서 중국 북경대학에서 제공 받아 사용하였다. 권백 100 g을 분쇄하여 70% EtOH 1000 ml로 환류하면서 3시간씩 2회 반복 추출하고 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 사용하였다.

### 세포 및 시약

신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblast (HDF)는 Modern Tissue Technology(MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 DMEM/F12(3:1) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10세대 세포를 실험에 이용하였다. Anti-MMP-1 antibody, anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase, phosphatase substrate 는 Sigma(USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

### DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 효과

항산화 활성은 DPPH(Aldrich, USA)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법<sup>14)</sup>을 활용하였다. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동일량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10분 동안 반응시킨다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Superoxide radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 NBT(nitroblue tetrazolium) 방법에 의해 측정하였다.<sup>15)</sup> 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer(pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 권백추출물을 가한 후 25°C에서 10분간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/ml xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25분 동안 반응 후 superoxide radical 소거효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포 생존률 측정

MTT(3-(4,5-dimethylthiazo2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide) 정량은 Mosmann<sup>16)</sup>의 방법을 변형하여 실시하였다. HDF를 2×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 96-well plate의 well에 권백 추출물을 세포에 투여하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액(5 µg/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100 µl acid-isopropanol(0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 570 nm에서 micro plate reader(Model ELX 800, BIO-TEK INSTRUMENTS INC, USA)로 흡광도를 측정하였다.

### UVA 조사 및 시료의 처리

HDF를 1.5×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 35 mm dish에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때 까지 배양한다. UV 조사 전에 원배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum 성분을 제거 후 6.3 J/cm<sup>2</sup> UVA(UVA F15T8.BLB, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. UVA 조사 후 배양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12(3:1) 배지에 권백추출물을 투여하여 24시간 배양하였다.

### MMP-1 발현저해 측정(ELISA법)

HDF에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24시간 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T(phosphate buffered saline+0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 3% BSA(bovine serum albumin)/PBS로 37°C, 1시간 동안 blocking한 후 monoclonal anti-MMP-1(mouse)을 1:3000으로 blocking solution(3% BSA)에 희석하여 150 µl씩 분주하고 37°C, 90분간 반응시켰다. Anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 1:3000으로 blocking solution에 희석하여 150 µl씩 분주하고 37°C, 90분간 반응시킨 후 PBS-T로 세척한 다음 diethanolamine buffer에 1 mg/ml pNPP(p-nitrophenyl phosphate)를 포함한 기질용액 150 µl를 넣어 실온에서 30분간 반응시켰다. 3 N NaOH 50 µl를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 micro plate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Table I** – Sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis

Gene	Primer sequences	Fragment size (bp)
MMP-1	F 5'-AAAGGGAATAAGTACTGGGC-3' R 5'-AATTCAGGAAAGTCATGTG-3'	237
β-Actin	F 5'-ATGCAGAAGGAGATCACTGC-3' R 5'-CTGCGCAAGTTAGGTTTTGT-3'	248

**RNA 분리 및 RT-PCR**

Total RNA 추출은 RNeasy mini kit(Qiagen, Germany)을 이용하였다. cDNA합성은 1 µg의 total RNA를 oligo(dT)<sub>15</sub> primer, dNTP(0.5 uM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase(Qiagen, Germany)로 37°C에서 60분, 93°C에서 5분 heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase Chain Reaction(PCR)은 cDNA로부터 MMP-1, β-actin를 증폭하기 위하여 1 µl cDNA, 0.5 uM의 5'과 3' primer, 10 × buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200 uM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 unit Taq polymerase (Qiagen, Germany)를 섞고 distilled water로 전체를 25 µl로 맞추고 다음 PCR을 실시하였다. PCR 증폭은 94°C 0.5분, 50°C 0.5분, 72°C 1분, 25 cycles로 반응시켰다. PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인 하였다. 본 실험의 RT-PCR에 사용된 primer는 Table I에 제시하였다.

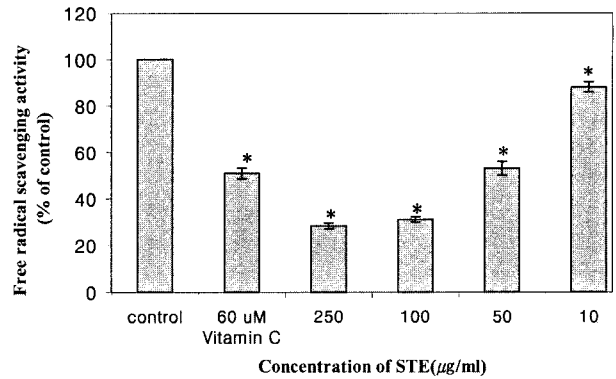
**자료분석 및 통계처리**

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

**실험결과 및 고찰**

**DPPH radical 소거 효과**

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측 할 수 있다. 유해산소라 불리는 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 인체 생체 기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발<sup>17)</sup> 하는 것으로 알려져 있으며 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되어 있다.<sup>18,19)</sup> 권백추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 vitamin C를 이용하여 권백추출물의 항산화 효과를 비교하였다.

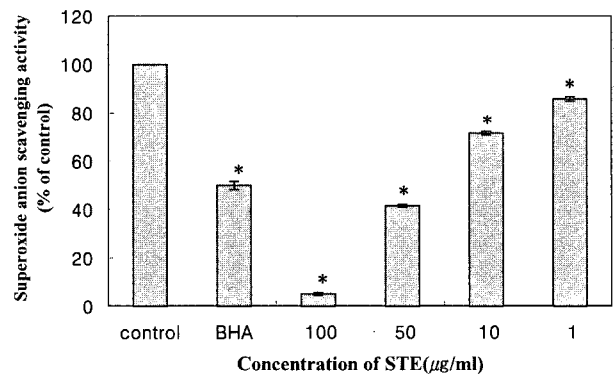


**Fig. 1** – Anti-oxidant effect of vitamin C and STE (*Selaginella tamariscina* extract) in the DPPH assay. A solution of 150 µl of 100 µM DPPH solution in methanol was gently mixed with 150 µl of STE for 10 min and the absorbance was measured at 565 nm. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \* p<0.05 compared with control.

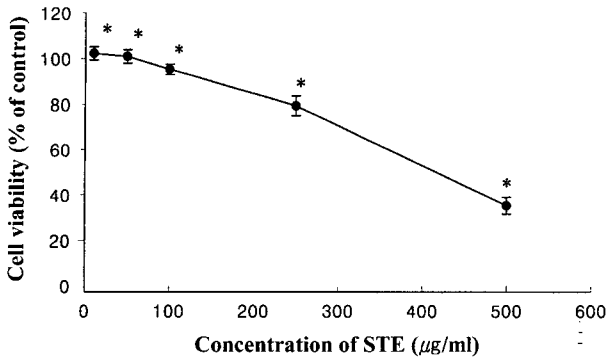
그 결과 vitamin C는 60 µM 에서 50%의 DPPH radical을 소거 하였으며, 권백추출물은 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈다(Fig. 1). 권백추출물을 10, 50, 100, 250 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각 DPPH radical 소거능은 12%, 47%, 69%, 72%로 나타났으며, IC<sub>50</sub>은 65.1 µg/ml의 소거능을 보여 우수한 free radical 소거효과를 나타내었다.

**Superoxide radical 소거 효과**

Xanthine/xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide 음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타난다.<sup>20)</sup> Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion의 생성저해의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 양성 대조군으로 BHA(3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole)를 이용하여 권



**Fig. 2** – Anti-oxidant effect of STE in the NBT assay. Superoxide radical was generated by a xanthine/xanthine oxidase system and measured by NBT reduction method. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \* p<0.05 compared with control (BHA : 0.2 mM 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole).



**Fig. 3** – Relative cell viability of STE on human dermal fibroblast by MTT assay. The cells were treated with various concentration of STE for 24 h. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*  $p < 0.05$  compared with control.

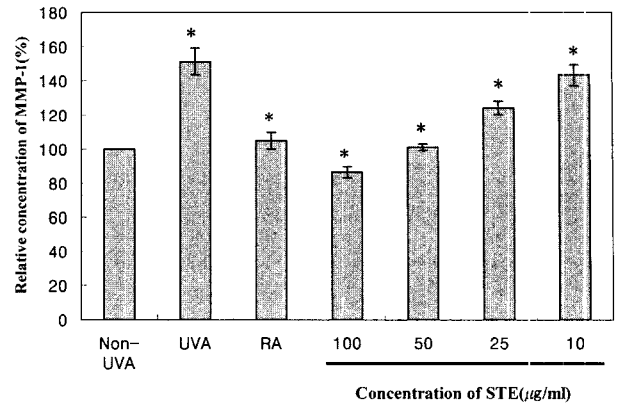
백추출물의 superoxide radical 소거효과를 비교하였다. 그 결과 권백추출물은 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타내 1, 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각 superoxide radical 소거능은 14.2%, 28.4%, 48.5%, 95%로 나타났으며, IC<sub>50</sub>은 40.9 µg/ml의 소거능을 보여 우수한 superoxide radical 소거효과를 나타내었다. 양성대조군인 BHA는 0.2 mM 에서 50%의 superoxide radical을 소거하였다.

**세포독성**

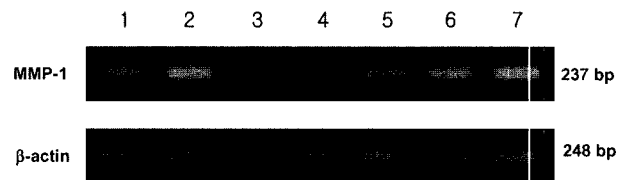
권백추출물의 세포독성측정과 더불어 실험에 사용될 농도 범위결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. HDF 세포에 대한 권백추출물의 세포 독성을 측정된 결과, 권백추출물은 129 µg/ml 이하의 농도로 처리시 세포생존율은 90% 이하로 저하되었으며 그 이상의 농도에서는 급격히 생존율이 저하되었다(Fig. 3). IC<sub>50</sub> 값은 418 µg/ml이었다.

**UVA에 의한 MMP-1 발현 저해 효과**

피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 AP-1의 활성도가 증가되는 신호전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가 시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다.<sup>21)</sup> 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 권백추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해 HDF에 6.3 J/cm<sup>2</sup> UVA를 조사하고 권백추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 MMP-1 발현저해 효과를 ELISA을 통해 알아보았다. 그 결과 권백추출물은 농도 의존적으로 MMP-1 발현저해 효과를 나타내었다. 권백추출물을 10, 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리한 경우 MMP-1 발현저해 효과는 5.6%, 21.7%, 49.5% 75.5%로 나타났으며, UV에 의한 c-Jun 단백질의 발현증가를 억제하여 MMP-1 발현저해 효과가 보고된<sup>22)</sup> retinoic acid의 경우는 3.5 µM에서



**Fig. 4** – The effect of STE on the production of MMP-1 by the UV irradiated human dermal fibroblast. The cells were treated with various concentration of STE for 24 h. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*  $p < 0.05$  compared with control (UVA : 6.3 J/cm<sup>2</sup>, RA : 3.5 µM retinoic acid).



**Fig. 5** – Effect of STE on MMP-1 mRNA expression in human dermal fibroblast irradiated with UVA. After irradiated UVA, HDF were treated with various concentration of STE for 12 h. Total RNA extracted from human dermal fibroblast was analyzed by RT-PCR. 1 : Non-irradiated, 2 : 6.3 J/cm<sup>2</sup> UVA irradiated, 3 : UVA+3.5 µM retinoic acid, 4 : UVA+STE 100 µg/ml, 5 : UVA+STE 50 µg/ml, 6 : UVA+STE 25 µg/ml, 7 : UVA+STE 10 µg/ml.

43.8% 발현저해 효과를 나타내었다(Fig. 4). 또한, HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1 mRNA에 권백추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과 농도 의존적으로 MMP-1 mRNA 발현을 저해하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 결론적으로 권백추출물은 HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1을 단백질 및 mRNA<sup>23,24)</sup> 수준에서 발현을 저해하는 효과가 확인 되었으며 이는 기존 보고된 retinoic acid 보다 우수한 효과를 나타내었다. 또한 HDF에서 UVA로부터 ROS가 생성되며, ROS로 인한 MMP발현<sup>25,26)</sup>이 촉진되는 것을 권백추출물이 ROS 소거작용을 통하여 MMP발현을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

**결론**

본 연구에서는 권백 추출물에 의한 항산화효과 및 HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 미치는 영향을 관찰하

었다. 권백 추출물의 DPPH와 superoxide radical 소거효과는 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 소거효과를 나타냈으며, 각각 250 µg/ml에서 72%, 100 µg/ml에서 95%로 DPPH와 superoxide radical을 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. HDF에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현저해효과는 권백추출물 100 µg/ml에서 75.5%로 단백질 수준에서 우수한 발현저해효과를 나타냈으며, mRNA 수준에서도 권백추출물은 모두 농도 의존적으로 발현 저해효과가 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 권백추출물은 항산화 효과와 UVA에 의한 MMP-1의 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 보아 우수한 항노화 소재로써 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

- Claude, S., Manabu, K., Laura, M. and Lester, P : Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radical Biol. & Med.* **26**, 174 (1999).
- Naqui, A., Chance, B. and Cadenas, E. : Reactive oxygen intermediate in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 137 (1986).
- Cadenas, E. : Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 79 (1989).
- Davies, K. J. : Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **262**, 9895 (1987).
- Park, S. N. : Skin aging and antioxidant. *J. Soc. Cos. Sci. Kor.* **23**, 75 (1997).
- Yaar, M. and Gilchrist, B. A. : Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors. *J. Investing. Dermatol. Symp. Proc.* **3**, 47 (1998).
- Li, J. J., Dong, Z., Dawson, M. I. and Colburn, N. H. : Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Research* **56**, 483 (1996).
- Bailly, C., Dreze, S., Asselineau, D., Nusgens, B., Lapiere, C. M. and Darmon, M. : Retinoic acid inhibits the production of collagenase by human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 47 (1990).
- Huang, C., Ma, W. Y., Dawson, M. I., Rincon, M., Flavell, R. A. and Dong, Z. : Blocking activator protein-1 activity, but not activation retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5826 (1997).
- Fisher, G. J., Kang, S. W. and Voorhees, J. J. : Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by Ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **101**, 1432 (1998).
- Fisher, G. J. and Voorhees, J. J. : Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem. Photobiol.* **69**, 154 (1999).
- Lee, K. S., Kim, S. J., Ryoo, Y. W. and Kim, B. C. : All-trans-retinoic acid down-regulates elastin promoter activity elevated by ultraviolet B irradiation in cultured skin fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* **17**, 182 (1998).
- Shin, D. and Kim, J. : Flavonoid constituents of *Selaginella tamariscina*. *Kor. J. Pharmacogn.* **22**, 207 (1991).
- Blois, M. S. : Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199 (1958).
- Furuno, K., Akasako, T. and Sugihara, N. : The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 19 (2002).
- Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods* **65**, 55 (1983).
- Kitahara, A., Matsumoto, U., Ueda, H. and Ueoka, R. : Aremarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of  $\gamma$ -irradiated methyl linolate. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2208 (1992).
- Hatano, T. : Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-Tannins and related polyphenols. *Natural Medicines.* **49**, 357 (1995).
- Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T. and Sakurai, H. : Activeoxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162 (1995).
- Kuppusamy, P. and Zweier, J. L. : Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**, 9880 (1989).
- Chun, J. H., Kang, S. W., Varani, J., Lin, J., Fisher, G. J. and Voorhees, J. J. : Decreased extracellular-signal regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol.* **115**, 177 (2000).
- Fisher, G. J., Talwar, H. S., Lin, J., Lin, P., McPhillips, P., Wang, Z. Q., Li, X., Wan, Y., Kang, S. W. and Voorhees, J. J. : Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **101**, 1432 (1998).
- Seo, J. Y., Rhie, G. E. and Chung, J. H. : Thre effect of ultraviolet irradiation on the expression of type I procollagen and MMP-1 in human dermal fibroblast and human skin *in vivo*. *Kor. J. Invest. Dermtaol.* **8**, 116 (2001).
- Seo, J. Y., Choi, H. R., Rhie, G. E., Youn, C. S., Choi, W. W., Kim, J. A., Chung, J. H., Kim, K. H., Cho, K. H. and Eun, H. C. : The effect of retionic acid and vitamin C on the expression

- of the procollagen  $\alpha 1(I)$ , tropoelastin, and MMP-1 in human dermal fibroblast. *Kor. J. Invest. Dermatol.* **8**, 23 (2001).
- 25) Kochanek, S. K., Wlaschek, M., Briviba, K. and Sies, H. : Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblast. *FEBS Lett.* **331**, 304 (1993).
- 26) Wlaschek, M., Briviba, K., Stricklin, G. P., Sies, H. and Kochanek, S. K. : Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 194 (1995).