

혈갈(*Draconis sanguis*)의 항산화와 사람섬유아세포에서 MMP-1 발현저해 효과

심관섭[†]·김진희·김진화·이동환·박성민·이범천·표형배

한불화장품(주) 기술연구소

Effects of the *Draconis sanguis* on Antioxidation and MMP-1 Expression in Human Dermal Fibroblast

Gwan Sub Sim[†], Jin Hui Kim, Jin Hwa Kim, Dong Hwan Lee, Sung Min Park,
Bum Chun Lee, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-gun, Chungbuk 369-834, Korea

요약: 태양광선에 노출된 피부에서는 자외선의 작용으로 활성산소종이 생성되어 세포의 기질 및 피부세포에 손상을 야기시킨다. 특히 자외선에 의해 손상을 받은 피부는 콜라겐 등의 세포의 기질에 영향을 주어 주름을 형성하는데, 이는 자외선에 의해 피부 내에서 콜라겐을 분해하는 효소(MMP)의 양이 증가하기 때문이라고 알려져 있다. 따라서, 활성산소종 소거 및 MMP의 발현을 저해하여 광노화로부터 피부를 보호할 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서는 광노화와 관련하여 혈갈의 기능을 알아보기 위하여 항산화 효과, *in vitro* MMP활성 저해능, 자외선 조사에 의해 유도된 MMP-1 발현에 대한 영향을 사람섬유아세포를 이용하여 확인하였다. 혈갈의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH radical과 superoxide anion radical 소거효과를 측정하였다. 그 결과 DPPH radical의 IC₅₀ 값은 183 µg/mL이고, xanthine/xanthine oxidase에 의한 superoxide anion radical의 IC₅₀ 값은 30 µg/mL이었다. MMP-1의 활성저해 결과는 농도 의존적으로 활성을 억제하였으며, IC₅₀ 값은 200 µg/mL이다. 또한 자외선 조사에 의해 발현되는 MMP-1에 대해 단백질의 양적인 변화는 74% 감소되었으며, 혈갈에 의해 농도 의존적으로 MMP-1 mRNA의 발현량도 감소되었다. 이러한 실험결과를 통하여 혈갈은 항산화 효과 뿐만 아니라 자외선 조사에 의해 유도되는 MMP-1 단백질 발현과 mRNA 유전자 수준에서의 조절이 가능함을 확인하였다. 결론적으로 혈갈은 항산화와 자외선으로부터 생성되는 MMP-1의 발현을 저해함으로써 광노화에 따른 피부를 보호하는 항노화 소재로서의 응용가능성을 확인하였다.

Abstract: UV irradiation produces free radicals and related reactive oxygen species (ROS), and these are injury to all most of organisms of skin cells and extracellular matrix (ECM). In addition, free radicals and ROS stimulate the overexpression of matrix metalloproteinases (MMPs) that can degrade most components of ECM such as collagen. Since collagen constitutes almost of skin connective tissue, their disarrangement causes wrinkle formation and droop of skin. Therefore, scavenging activity on free radicals, ROS and suppression of MMP-1 is expected to prevent skin photoaging. In this study, to investigate the relationship between photoaging and *Draconis sanguis*, we examined the effects of antioxidant, *in vitro* MMP inhibition and expression of UVA-induced MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Draconis sanguis* was found to show scavenging activities of radicals and ROS with the IC₅₀ values of 183 µg/mL against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and 30 µg/mL against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. *Draconis sanguis* inhibited the activities of MMP-1 in a dose-dependent manner and the IC₅₀ value calculated from semi-log plots was 200 µg/mL. Also, UVA induced MMP expression was reduced 74% by treatment with *Draconis sanguis*, and MMP-1 mRNA expression was reduced in a dose-dependent manner. Therefore *Draconis sanguis* was able to significantly inhibit MMP expression in protein and mRNA level. All these results suggested that *Draconis sanguis* may act as an anti-photoaging agent by antioxidation and reducing UVA-induced MMP-1 production.

Keywords: *Draconis sanguis*, antioxidant, MMP, human dermal fibroblast, UVA

[†] 주 저자 (e-mail: gssim@hanbul.co.kr)

1. 서 론

피부 노화는 크게 시간의 흐름에 따라 자연적으로 진행되는 내인성 노화(intrinsic aging)와 오랫동안 햇빛에 노출된 얼굴, 손등, 목 등의 피부에서 관찰되는 광노화(photoaging)로 나눌 수 있으며 광노화는 내인성 노화 현상과 자외선에 의한 노화 현상이 복합적으로 나타난 결과라고 볼 수 있다[1]. 자외선에 의한 피부노화 현상에 중요한 영향을 미치는 인자는 자외선에 의해 비정상적으로 생성량이 증가되는 활성산소종(ROS)과 자유 라디칼(free radical)의 작용이다. 활성산소종은 정상적인 세포 내에서도 미토콘드리아와 마이크로솜 등의 세포 소기관의 대사 작용과 프로스타글란딘 생합성 등의 염증 반응에서도 생성되며, 이는 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) 등의 효소적인 자체 방어 기구와 비타민, 플라보노이드 등의 비 효소적인 항산화제에 의해 균형을 이루어 정상적인 생육이 진행될 수 있다. 그러나 자외선, 공해물질, 화학약품, 스트레스 등의 환경적 요인과 비정상적인 대사 작용으로 인해 superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (OH^{\cdot}), 과산화 수소 (H_2O_2), nitric oxide (NO^{\cdot}), peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) 등의 활성산소종 및 철, 구리 등의 transition metal ion 등이 생성된다[2]. 이들은 쌍을 이루지 못한 홀전자를 가지거나 이온성을 띠어 강력한 반응성을 나타냄으로써 세포막 지질에 대한 연쇄적인 손상, DNA, 기능 단백질, 미토콘드리아 등의 대부분의 세포 기관을 손상시켜 자체 회복력을 저하시키게 된다[3,4].

MMPs는 피부의 fibroblast, keratinocyte 등에서 분비되어 세포외 기질(ECM)과 basement membrane (BM, 기저막)을 구성하는 대부분의 성분을 분해함으로써 피부 탄력을 유지하는 결합조직이 파괴되어 주름과 탄력저하, 피부 처짐의 원인이 된다[5].

MMPs의 발현에는 여러가지 단백질들이 관여하는 신호전달 cascade들이 있는데, Brenneisen 등은 UV에 의한 MMPs의 발현 개시에 주목하여 UV에 의해 세포막과 주변에서 생성된 활성산소종이 지질 과산화와 DNA 손상을 통해 각종 염증과 암, 돌연변이 등을 유발하는 것처럼 MMPs 발현 signal cascade의 개시에 관여한다고 설명하고 있다[6]. 즉, 자외선에 의해 생성되는 자유라디칼을 소거하고 이것들로 인해 비정상적으로 과발현되는 MMPs를 억제하면 피부 주름의 생성을 개선할 수 있을 것으로 기대 된다.

혈갈은 기린갈(麒麟竭), dragon's blood라고도 하며, 중국과 동남아에 서식하는 종려과 식물(*Daemonorops draco*)에서 얻어지는 수지를 압착하여 얻어낸 덩어리 형태의 약재이다. 동의보감, 잡병편에 의하면 상처를 수렴하여 새살이 돋게하고 쇠 등에 의한 상처 치유와 방부의 목적으로

로 탁월한 효능을 갖는 약재로 알려져 있다. 1960년대부터 Merlini와 Arnone 등에 의해 혈갈에서만 발견되는 수종의 aglycone과 anthocyanidin 등의 flavonoid류를 분리, 보고한 바 있고, 그 외에 oleanoic acid와 ursonic acid 유도체 등의 terpenoids가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[7].

본 연구는 한약재로 알려져 있는 혈갈의 항산화 활성, MMP-1 효소 활성 저해 효과 및 UVA를 조사한 사람섬유아세포에서 MMP-1 발현 저해 효과를 검색하여 항노화 소재로 이용하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 혈갈(*Draconis sanguis*)은 중국산으로서 서울 경동시장에서 구입하여 분쇄한 후, 에탄올에 용해하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 시약으로서 phosphate buffered saline (PBS), Dulbeccos Modification of Eagles medium (DMEM), HAM'S F-12 등은 Bio-Whittaker (Cambrex, MD, USA) 제품을 사용하였으며, trypsin/EDTA, penicillin/streptomycin 등은 Gibco (Invitrogen, NY, USA)사 제품을 anti-MMP-1 antibody, anti-mouse IgG conjugate alkaline phosphatase, phosphatase substrate는 Sigma (USA)사 제품을 이용하였다.

2.2. 세포 배양

실험에 사용된 섬유아세포는 신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblast (HDF)로 Modern Tissue Technology (MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 DMEM/F12 (3:1) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10 세대 세포를 실험에 이용하였다.

2.3. DPPH에 의한 자유라디칼 소거 효과

항산화 활성은 DPPH (Aldrich, USA)를 이용하여 시료의 라디칼 소거 효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법[8]을 활용하였다. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동일량의 혈갈을 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10 min 동안 반응시킨다. 이후 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. Superoxide Radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거 효과는 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법에

의해 측정하였다[9]. 50 mM Na₂CO₃ buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 혈갈을 가한 후 25°C에서 10 min간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/mL xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25 min 동안 반응 후 superoxide radical 소거효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. MMP-1 (Collagenase) 효소 활성저해 효과

MMP-1 효소 활성 저해 효과를 측정하기 위하여 형광 분석법을 이용하였다. 실험에 사용한 기질은 형광물질이 표지된 DQ-collagen, 효소(collagenase)는 molecular probe (Eugene, OR, USA)사에서 시판중인 제품을 사용하였으며, well plate에 반응완충액, DQ-collagen과 실험물질을 농도별로 희석하여 첨가하고, 각 well에 0.5 unit collagenase를 첨가하였다. 암소, 실온에서 20 min 경과 후 형광 분광광도계(Perkin Elmer, USA)를 이용하여 흡수파장 495 nm, 방출파장 515 nm로 형광값을 측정하며, 대조군으로서 효소액 대신 반응완충액을 효소와 동량 첨가하여 형광값을 측정하였으며 시료 자체의 형광값도 측정하여 효소활성 계산시 보정하였다.

2.6. UVA 조사 및 시료의 처리

섬유아세포를 1.5 × 10⁵ cells/mL의 농도로 35 mm dish에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한다. UV 조사전에 원배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum 성분을 제거 후 6.3 J/cm² UVA (UVA F15T8BLB, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. UVA 조사후 배양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3:1) 배지에 혈갈을 처리하여 24 h 배양하였다.

2.7. UVA에 의한 MMP-1 발현 저해 효과(ELISA법)

섬유아세포에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24 h 배양한 배지를 96 well plate에 분주하고 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 세척하고 3% bovine serum albumin (BSA)/PBS로 37°C에서 90 min간 blocking한 후 primary antibody를 37°C에서 90 min간 처리한다. 다시 세척 후 secondary antibody인 anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 37°C에서 90 min간 처리한다. PBS-T로 세척 후 substrate solution을 넣고 반응시킨 후 microplate reader을 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA 추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, Maryland, Germany)을 이용하였다. cDNA합성은 omniscrypt reverse

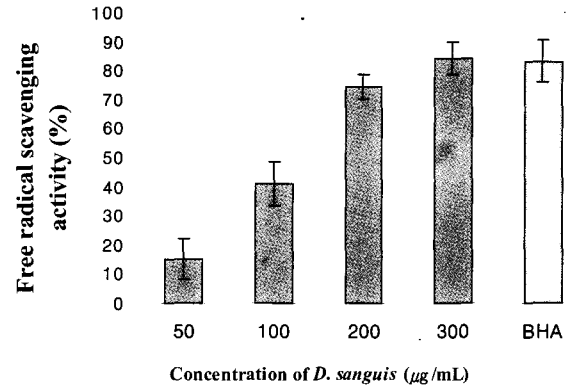


Figure 1. Antioxidant effect of *Draconis sanguis* and BHA in the DPPH assay. A solution of 150 μL of 100 μM DPPH solution in methanol was gently mixed with 150 μL of *Draconis sanguis* for 10 min and the absorbance was measured at 565 nm. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. (BHA: 100 μg/mL 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole).

transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 수행하였다. Polymerase Chain Reaction (PCR)은 cDNA로부터 MMP-1, β-actin을 증폭하기 위하여 Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 MMP-1과 β-actin 유전자의 발현을 확인하였다.

2.9. 자료분석 및 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH에 의한 자유라디칼 소거 효과

자외선, 공해물질 등의 각종 유해환경에 의해 세포막 주변에서 생성되는 자유라디칼은 막 지질을 공격하여 연쇄적인 라디칼 반응을 유발시킴으로써 과산화 지질을 축적시키고, 세포 내 단백질을 손상, 유전자의 돌연변이를 유발한다. 이는 세포의 기능저하와 노화의 주된 원인으로 지목된다[24]. Ascorbic acid와 tocopherol 등의 비타민류, quercetin, luteolin 등의 flavonoid류 및 다양한 식물 추출물의 항산화 활성이 보고되어 있다[10]. 안정한 자유라디칼의 모델로서 DPPH radical에 대한 소거활성을 측정함으로써 자유라디칼의 소거활성과 지질 과산화의 초기 반응 억제정도를 예측할 수 있다.

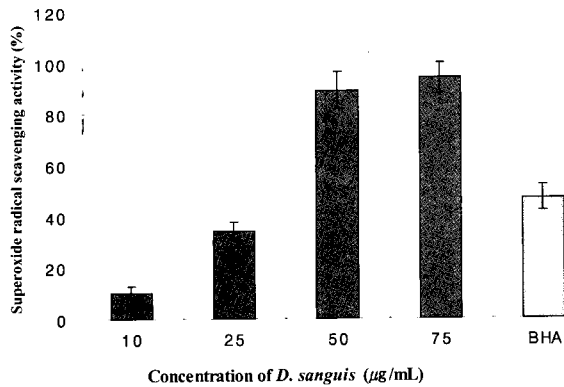


Figure 2. Antioxidant effect of *Draconis sanguis* in NBT assay. Superoxide radical was generated by a xanthine/xanthine oxidase system and measured by NBT reduction method. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. (BHA: 50 µg/mL 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole).

혈갈의 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과, 50, 100, 200, 300 µg/mL의 농도에서 각각 15, 41, 74, 84%의 소거능을 나타내어 농도에 의존적으로 활성이 증가되는 양상을 나타내었고, IC₅₀값은 183 µg/mL으로 나타났다(Figure 1).

3.2. Superoxide Radical 소거 효과

Xanthine oxidase가 기질 xanthine과 반응하여 uric acid로 전환될 때 O₂^{•-}가 생성된다. 항산화제가 소거하고 남은 O₂^{•-}와 NBT가 반응하여 diformazan으로 전환되면 보라색으로 발색되며 이를 정량하여 superoxide anion 소거활성을 측정할 수 있다. 따라서 xanthine/xanthine oxidase system에서의 항산화 활성은 superoxide anion의 소거뿐만 아니라 xanthine oxidase에 대한 저해활성도 함께 나타난다.

혈갈의 superoxide anion 소거활성을 측정하기 위하여 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)과 비교하여 농도별로 측정하였다. 10, 25, 50, 75 µg/mL의 농도에서 10, 34, 89, 94%의 소거능을 나타내었으며 농도 의존적으로 활성이 증가하는 양상을 나타내었다. 혈갈의 IC₅₀값은 30 µg/mL으로 나타났으며 이는 positive control로 사용한 BHA의 IC₅₀값(43 µg/mL)과 비교하여 우수한 활성을 나타내었다(Figure 2).

3.3. *In vitro* MMP-1 (Collagenase) 저해효과

콜라겐은 결합조직의 탄력을 나타내며 진피를 구성하는 단백질의 70%를 차지한다. 이러한 콜라겐을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 콜라겐 type I을 분해하는 MMP-1으로 이러한 MMP-1의

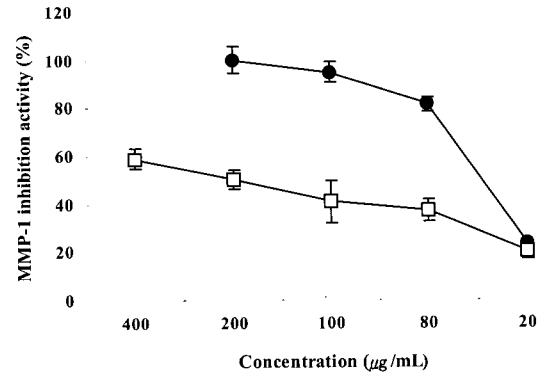


Figure 3. Determination of IC₅₀ values for the inhibition of collagenase (MMP-1). Fluorometric assays of the activities of MMP-1 was performed in the presence of increasing concentrations of *Draconis sanguis* (□) and 1,10-phenanthroline (●).

효소활성을 저해하거나 발현을 억제하는 활성을 가진 물질은 콜라겐을 보호하여 피부조직의 기계적 특성을 유지시켜 탄력과 피부가 늘어지는 것을 방지한다. 따라서 MMP 저해 효과가 있는 소재는 주름을 개선하고 탄력 있는 피부 유지에 유용하게 사용될 수 있으므로 혈갈에 대한 MMP-1의 효소활성 저해 효과를 측정하였다. 양성 대조군인 1,10-phenanthroline의 경우 100 µg/mL에서 94.67%의 효소활성을 저해하였으며, IC₅₀은 49.74 µg/mL로 나타났고, 혈갈의 MMP-1 저해 효과는 20, 80, 100, 200, 400 µg/mL 농도에서 효소활성을 각각 20%, 37%, 41%, 50%, 59% 저해하였으며, IC₅₀은 200 µg/mL로 나타났다(Figure 3).

3.4. ELISA를 이용한 MMP-1 발현 저해 효과

피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 activator protein-1 (AP-1)의 활성도가 증가되는 신호전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다 [11]. 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 혈갈이 미치는 영향을 알아보하고자 섬유아세포에 6.3 J/cm² UVA를 조사하고 혈갈을 첨가하여 24 h 배양한 후 MMP-1 발현 저해 효과를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)을 통해 알아보았다. 그 결과 혈갈은 농도 의존적으로 MMP-1 발현저해 효과를 나타내었다. 혈갈을 1, 5, 10 µg/mL의 농도로 처리한 경우 MMP-1 발현저해 효과는 35%, 55%, 74%로 나타났으며, UV에 의한 AP-1과 NF-κB의 활성도 증가를 억제하여 MMP 발현 저해 효과가 보고된 [12] (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)의 경우는 5 µg/mL에서 76.42% 발현저해 효과를 나타내었다(Figure 4).

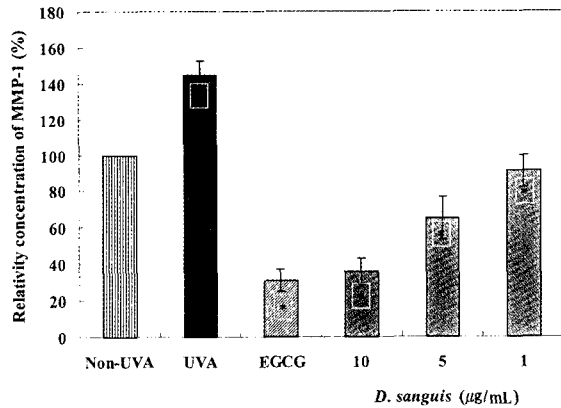


Figure 4. The effect of *Draconis sanguis* on the production of MMP-1 by the UV irradiated human dermal fibroblast. The cells were treated with various concentration of *Draconis sanguis* for 24 h. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. * $p < 0.05$ compared with control. (UVA: 6.3 J/cm², EGCG: 10 µg/mL)

3.5 RT-PCR를 이용한 MMP-1 mRNA 발현 저해 효과

혈갈이 섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과 농도 의존적으로 MMP-1 mRNA 발현을 저해하는 것을 알 수 있었다(Figure 5).

Scharffetter 등[13]은 배양된 섬유아세포에 5~60 J/cm²의 UVA를 1회 조사하여 MMP-1 유전자 발현이 증폭됨을 관찰하였으며 Wlaschek 등[14]도 UVA를 조사시 MMP-1 유전자 발현이 증폭되는 것을 관찰한 바 있다. UVA 조사로 인해 MMP-1 유전자의 발현이 증가되는 기전은 아직 확실치 않으나 MMP-1 유전자가 발현되는 과정 중 신호전달(signal transduction) 과정과 전사(transcription) 과정 모두에 UVA의 자극이 관여할 것으로 생각되고 있다. 즉, UVA 조사에 의해 섬유아세포에서 MMP-1의 유전자 발현을 자극하는 전사 인자(transcriptional factor)로 알려져 있는 AP-1의 활성화도 증가됨이 보고된 바 있다[15]. Barthelman 등[16]과 Fisher 등[17]은 각각 EGCG와 all-trans-retinoic acid가 자외선에 의한 AP-1의 활성화도 증가를 방지함으로써 MMP-1 유전자 발현이 감소함을 보고하였다. 결론적으로 혈갈은 섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1을 단백질 및 mRNA 수준에서 발현을 저해하는 효과가 확인되었으며 이는 기존 보고된 EGCG와 유사한 우수한 효과를 나타내었다. 따라서 섬유아세포에서 혈갈은 UVA로부터 생성된 ROS를 소거하거나 신호전달(signal transduction) 과정에 관여하여 MMP발현을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

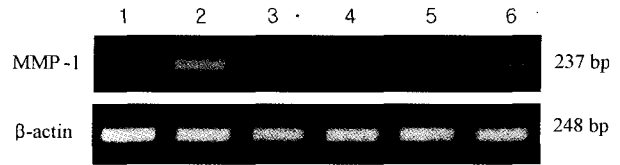


Figure 5. Effect of *Draconis sanguis* on MMP-1 mRNA expression in human dermal fibroblast irradiated with UVA. After irradiated UVA, human dermal fibroblast were treated with various concentration of *Draconis sanguis* for 24 h. Total RNA extracted from human dermal fibroblast was analyzed by RT-PCR. Lane 1: Non-UVA irradiated, lane 2: 6.3 J/cm² UVA irradiated, lane 3: UVA + EGCG (10 µg/mL), lane 4: UVA + *Draconis sanguis* (10 µg/mL), lane 5: UVA + *Draconis sanguis* (5 µg/mL), lane 6: UVA + *Draconis sanguis* (1 µg/mL).

4. 결 론

자외선에 의해 생성되는 free radical과 활성산소종은 피부세포의 유전자 돌연변이와 막지질의 과산화, ECM 손상을 유도하며 collagen 등의 결합조직을 분해하는 MMPs 발현의 원인이 된다.

본 연구에서는 혈갈에 의한 항산화 효과, *in vitro* MMP-1 효소 활성 저해 효과 및 섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 미치는 영향을 관찰하였다. 혈갈의 DPPH와 superoxide radical 소거효과는 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 소거효과를 나타냈으며, IC₅₀은 각각 183 µg/mL, 43 µg/mL로 DPPH와 superoxide radical을 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. MMP-1 효소 활성 저해 효과도 200 µg/mL에서 IC₅₀을 나타내 우수한 효과를 나타내었다. 사람섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현 저해효과는 혈갈 10 µg/mL에서 74%로 단백질 수준에서 우수한 발현저해효과를 나타내었으며, mRNA 수준에서도 혈갈은 모두 농도 의존적으로 발현 저해효과가 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 혈갈은 항산화효과, MMP-1 효소 활성저해 효과와 UVA에 의한 MMP-1의 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 보아 자외선에 의한 피부의 광노화를 개선할 수 있는 소재로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. B. A. Gilchrest, M. Garmyn, and M. Yaar, Aging and photoaging affect gene expression in cultured human keratinocytes, *Arch Dermatol.*, **130**, 28 (1994).
2. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, Free radicals

- in biology and medicine: Third edition, Oxford Science Publications (1999).
3. L. L. Ji, Antioxidants and oxidative stress in exercise, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **222**, 283 (1999).
 4. A. W. Girotti, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J. Lipid Res.*, **39**, 1529 (1998).
 5. S. Netzel-Arnett, D. J. Mitola, S. S. Yamada, K. Chrysovergis, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, and T. H. Bugge, Collagen dissolution by keratinocytes requires cell surface plasminogen activation and matrix metalloproteinase activity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 45154 (2002).
 6. P. Brenneisen, H. Sies, and K. Scharffetter, Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases from induction via signaling to initial events, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **973**, 31 (2002).
 7. 서울대학교 천연물화학 연구소 공저, 동양의약과학대전, 서울대학교 학술편수관 (2003).
 8. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 9. K. Furuno, T. Akasako, and N. Sugihara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Phar. Bull.*, **25**, 19 (2002).
 10. G. S. Sim, J. H. Kim, S. M. Park, B. C. Lee, Y. P. Yun, Y. H. Zhang, and H. B. Pyo, Effect of the *Selaginella tamariscina* extract on antioxidation and inhibition of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts, *Yakhak Hoeji*, **48**, 165 (2004).
 11. J. H. Chun, S. W. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Decreased extracellular signal regulated kinase and increased stress activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 177 (2000).
 12. J. G. Kim, J. S. Hwang, Y. K. Cho, Y. G. Han, Y. J. Jeon, and K. H. Yang, Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB-induced skin damage, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **14**, 11 (2001).
 13. K. Scharffetter, M. Wlaschek, and A. Hogg, UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts *in vitro* and *in vivo*, *Arch. Dermatol. Res.*, **283**, 506 (1991).
 14. M. Wlaschek, K. Bolsen, G. Herrmann, A. Schwarz, F. Wilmroth, P. C. Heinrich, G. Goerz, and K. Scharffetter, UVA induced autocrine stimulation of fibroblast derived collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage?, *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 164 (1993).
 15. H. C. Kim, J. S. Yang, Y. S. Chae, K. S. Suh, and S. T. Kim, The effect of all-trans-retinoic acid and ursolic acid on the ultraviolet A radiation induced AP-1(Fos/Jun) activity in cultured human dermal fibroblasts, *Kor. J. Invest. Dermatol.*, **35**, 1136 (1997).
 16. M. Barthelman, W. B. Bair, K. K. Stickland, W. Chen, B. N. Timmermann, S. Valcic, Z. Dong, and G. T. Bowden, (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity, *Carcinogenesis*, **19**, 2201 (1998).
 17. G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. W. Kang, and J. J. Voorhees, Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature*, **379**, 335 (1996).