

NIH3T3 세포에서 UVB에 의한 세포고사에 미치는 옷 추출물과 fisetin의 효과

김돈영 · 황은희¹ · 박종균*

원광대학교 생명과학부, ¹원광대학교 식품영양학과

Received January 19, 2005 / Accepted February 4, 2005

Effect of *Rhus verniciflua* Stokes Extract and Fisetin on UVB-induced Apoptosis in NIH3T3 Cells.

Don Young Kim, Eun Hee Hwang¹ and Jong Kun Park*. *Division of Biological Science, Wonkwang University, Department of Food and Nutrition, Wonkwang University* – For a long time *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) has been traditionally used as a herbal plant in Asia. In this study, we have investigated the effect of acetone extract of *Rhus verniciflua* Stokes (RVSE) and fisetin, a component of RVSE, on DNA damage response in NIH3T3 cells. Exposure of cells to UVB light (200 J/m²) and postincubation in growth medium for 48 hr resulted in a decrease of cell viability to about 10-20% of nontreated control. Addition of various concentrations of RVSE in the postincubation medium, however, significantly increased the cell viability as compared with the values expected. The genotoxicity-decreasing effect was also demonstrated in cells exposed to UVB light and incubated in medium containing fisetin. The genotoxicity-decreasing effect of RVSE and fisetin was further demonstrated by various analyses including cell morphology studies, trypan blue exclusion assay and DAPI staining. By Annexin V binding analysis, RVSE and fisetin were shown to decrease the early apoptosis induced by UVB exposure. These results suggest the RVSE contain components that either increase the DNA repair or decrease the apoptosis in UVB-exposed cells.

Key words – RVS, fisetin, UVB, genotoxicity, apoptosis

옷나무는 생리활성물질의 약리적 가치 때문에 우리 선조들은 한방에서 내종의 치료제로써 사용해 왔으며[28,29], 일상생활에서는 가구의 장식과 보존을 위해 도료 또는 방부제로써 사용해왔다. 또한 민간에서는 옷순을 식용하고 옷순주를 담아 먹기도 하며, 옷담을 이용하며, 옷겉질이나 즙을 위장병과 숙취해소에 특효가 있다하여 약용으로 복용하여 왔다[8]. 따라서 옷나무에는 다양한 기능성 물질이 포함되어 있는 것으로 추정되어 왔으나 생물학적 기능에 대한 연구 결과는 혈중 콜레스테롤이나 종양 증식에 대한 감소, 항산화 작용이나 면역증진효과 등 제한된 범위내에서 보고되고 있다[11,7,3,22].

태양으로부터 방출되는 자외선은 중요한 환경적인 요인으로 많은 세포들의 증식, 생존 그리고 기능에 영향을 끼친다. 자외선은 파장에 따라 3가지 형태로 분류되는데 파장이 긴 UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) 그리고 파장이 짧은 UVC (200-280 nm)로 분류된다[9]. 자외선에 조사된 세포의 DNA 상해는 세포주기의 정지, DNA 회복 활성, 세포의 죽음과 같은 DNA 상해 반응을 유발한다[19,20,27].

DNA 상해 반응이나 유전 독성에 대해 변화를 유발하는 천연물들을 검색하는 일은 항암제나 항노화제, 자외선 보호제 등의 개발과 관련하여 중요한 의미를 갖는다[24,26]. 유전

독성을 감소시키는 천연물들의 활성은 DNA 상해원의 해독 과정에 수반되는 활성산소종의 수준을 감소시키는 항산화활성[2,22], 천연물의 직접적인 결합에 의한 DNA 상해원 농도의 감소[14], DNA 회복능이나 DNA 상해 반응의 신호 전달 수준의 증가 등이 포함될 수 있다[6,16].

본 연구자 등은 다양한 천연물 재료들을 대상으로 알킬화제 상해 반응에 대한 검색 작업을 수행하여 왔고[5,6], 자외선 상해 반응에 대한 변화를 유발하는 물질로는 옷의 아세톤 추출물 및 이 추출물의 성분 중 하나로 본 연구팀에 의해 규명된 fisetin이 선정되었다. 본 연구에서는 섬유아세포인 NIH3T3 세포에서 UVB에 의한 세포고사를 옷 추출물과 옷 추출물 분리성분인 fisetin이 예방하고 세포를 보호하는 효과가 있는지 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양

실험에 사용한 세포주는 한국세포주은행에서 분양받은 mouse 섬유아세포인 NIH3T3 세포를 이용하였고, 이 세포들은 plastic petri dishes상에서 37°C CO₂ humidified incubator에서 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml)이 존재하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, 미국) 조건에서 배양하였고, exponential phase의 세포들을 0.025% trypsin-EDTA를 이용하여 계대배양하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-63-850-6200, Fax : +82-63-843-2781

E-mail : jkpark@wonkwang.ac.kr

옷 추출물(RVSE)의 제조와 성분 분석 및 fisetin의 이용

옷추출물은 생명의 나무(주)로부터 제공받았는데 그 제조 과정은 다음과 같다. 우선 옷나무의 목재부를 10 cm의 길이로 절단하여 그늘에서 1개월 정도 건조한 다음, 400 g의 건조된 옷나무에 99.9%의 아세톤 1 liter를 가하고 40℃에서 5일간 방치하여 노란색을 띤 추출물을 얻었다. 이 추출물에 동량의 물을 가하고 40℃에서 교반한 다음 실온에서 식히고 No. 2 여과지(Whatman, 미국)를 이용하여 여과한 후 여과물을 회전식 진공증발기(Resona Co., 스위스)로 농축한 후 원심진공건조하여 조추출물을 얻었는데 수율은 1.1%였다. 이 추출물을 DMSO로 녹여 100 mg/ml의 농축용액을 만들고 -20℃에 보관하여 필요한 농도만큼 희석하여 사용하였다. HPLC 분석 결과 이 추출물에는 알레르기 반응을 유발하는 urusiol이 존재하지 않고, fisetin, butein, fustin, sulfretin 등의 flavonoid가 포함되어 있음을 규명하였다. 이들 flavonoid 성분들은 Sigma (미국)에서 구입하여 각각 적정 용매로 농축 용액을 만들어 -20℃에 보관하여 실험을 수행할 때 필요한 양만큼 희석하여 사용하였는데, 본 연구 목표인 UVB에 의한 세포고사를 감소시키는 효과는 fisetin이 제일 우수한 것으로 본 연구팀에 의해 선정되었다.

세포 형태 분석

세포를 35 mm 배양접시에 동일 양을 분주하여 하루를 배양한 후 UVB (200 J/m²)를 처리한 후 조건에 맞는 농도의 옷 추출물 및 fisetin을 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후 세포들의 형태가 어떻게 변화하였는지를 현미경(×200)으로 관찰하였다.

Trypan blue 배제 분석

자외선을 조사하거나 조사하지 않은 세포들을 대상으로 옷추출물 또는 fisetin을 적정시간 처리한 후 phosphate-buffered saline (PBS, 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 12 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄)로 세척하고 trypsin-EDTA를 이용하여 수확하였다. 수확한 세포를 PBS 200 μl로 희석하고 같은 양의 0.8% trypan blue (Sigma)를 첨가하였다. Hemocytometer를 사용하여 약 200개 정도의 세포에 대해 trypan blue가 세포로 흡입된 그룹과 그렇지 않은 그룹으로 나누어 세포의 수를 세어 trypan blue가 흡입된 세포 수 / total 세포의 수의 퍼센트를 구해 세포의 생존율을 알아보았다.

자외선을 조사하거나 조사하지 않은 세포들을 대상으로 옷추출물 또는 fisetin을 적정시간 처리한 후 세포를 수확하고, 수확한 세포를 PBS 200 μl로 희석한 후 DAPI를 첨가하였다. DAPI를 첨가한 후 실온에서 20분간 염색한 후에 핵의 분절 정도를 형광현미경(Zeiss Axioskop 2 Plus)을 사용하여 관찰하였다.

4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 염색에 의한 핵 분절 분석

자외선을 조사하거나 조사하지 않은 세포들을 대상으로 옷추출물 또는 fisetin을 적정시간 처리한 후 세포를 수확하고, 수확한 세포를 PBS 200 μl로 희석한 후 Annexin V (BM Roche, 독일)를 첨가하였다. Annexin V를 첨가한 후 실온에서 15분간 염색한 후에 Annexin V 결합 정도를 형광현미경(Zeiss Axioskop 2 Plus)을 사용하여 관찰하였다.

Annexin V 결합분석

자외선을 조사하거나 조사하지 않은 세포들을 대상으로 옷추출물 또는 fisetin을 적정시간 처리한 후 세포를 수확하고, 수확한 세포를 PBS 200 μl로 희석한 후 Annexin V (BM Roche, 독일)를 첨가하였다. Annexin V를 첨가한 후 실온에서 15분간 염색한 후에 Annexin V 결합 정도를 형광현미경(Zeiss Axioskop 2 Plus)을 사용하여 관찰하였다.

결 과

옷나무 추출물(RVSE)과 옷나무 추출물 분리 성분인 fisetin을 처리한 세포에서의 형태 변화

NIH3T3 세포에 옷나무 추출물(RVSE)과 옷나무 추출물 분리 성분인 fisetin을 처리하고 48시간 동안 반응시킨 후 현미경을 이용하여 세포의 형태가 어떻게 변화하는지를 관찰하였다. RVSE는 50, 100, 200, 300, 400 μg/ml 농도로(Fig. 1A), fisetin은 50, 75, 100, 300, 500 μM 농도로 처리하였다(Fig. 1B). RVSE와 fisetin을 고농도로 처리 하였을 때는 세포에 대한 독성이 증가하여 세포가 둥그렇게 되며 세포의 집단으로부터 점차 떨어져 나가는 세포고사로 진행되는 것을 관찰할 수 있었다.

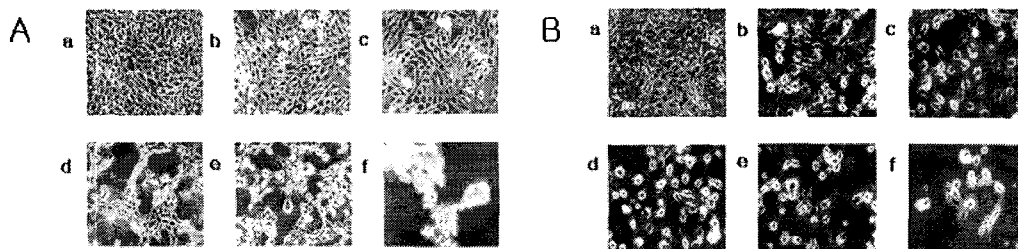


Fig. 1. Morphological change of NIH3T3 cells treated for 48 h with various concentrations of RVSE (A) or fisetin (B). NIH3T3 cells were incubated with growth medium containing various concentrations of RVSE (Panel A, a, 0 μg/ml; b, 50 μg/ml; c, 100 μg/ml; d, 200 μg/ml; e, 300 μg/ml; f, 400 μg/ml) or fisetin (Panel B, a, 0 μM; b, 50 μM; c, 75 μM; d, 100 μM; e, 300 μM; f, 500 μM). Original magnification, ×200. The data represent a typical result of three similar experiments.

UVB에 의한 유전독성에 RVSE와 fisetin이 어떠한 효과를 보이는지 알아보기 위해 NIH3T3 세포에 UVB (200 J/m²)를 조사한 후 RVSE와 fisetin을 처리하고 48시간 동안 반응시킨 후 형태가 어떻게 변화하는지를 관찰하였다(Fig. 2A와 B). 그 결과 UVB를 조사하고 배양배지 만을 처리한 그룹(Fig. 2A와 B의 a)은 UVB에 의한 유전독성으로 세포고사가 상당히 유도된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 UVB를 조사한 후 RVSE와 fisetin을 농도별로 첨가하여 처리한 그룹(Fig. 2A와 B의 b-f)에서는 UVB에 의한 세포 고사가 현저히 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

자외선을 조사한 NIH3T3 세포의 생존율에 대한 RVSE와 fisetin의 효과

Trypan blue 배제분석을 수행하여 자외선을 조사한 NIH3T3 세포의 생존율에 대한 RVSE와 fisetin의 효과를 관찰하였다. 실험은 UVB를 조사한 그룹과 UVB를 조사하지 않은 그룹으로 나누어 수행하였다(Fig. 3A와 B). UVB를 조사하지 않은

그룹(Fig. 3A와 B의 하얀 막대)에서는 고농도의 RVSE와 fisetin에서만 세포독성에 의한 생존을 감소를 보여 주었다. 한편, UVB를 조사한 그룹(Fig. 3A와 B의 회색 막대)의 경우, UVB를 조사한 후 배양배지만 처리한 그룹은 UVB에 의한 유전독성으로 인해 세포의 생존율이 정상 대조군에 비해 10-20% 정도로 현저히 감소하였다. 그러나, UVB를 조사한 후 RVSE나 fisetin을 다양한 농도별로 첨가하여 처리한 그룹은 UVB와 윗추출물 성분이 서로 독립적으로 작용하였을 때 예상되는 세포고사의 정도(Fig. 3A와 B의 점선부분)보다 현저히 증가된 세포생존율을 보여주며, UVB의 독성으로부터 상당한 수준의 보호효과를 보여준다. 이는 RVSE와 fisetin이 NIH3T3 세포에서 UVB를 조사함으로써 생기는 생존을 저하를 방어할 수 있음을 시사한다.

자외선 조사에 의한 NIH3T3 세포의 핵분열에 대한 RVSE와 fisetin의 효과

UVB에 의한 세포의 사멸이 세포고사인지와 그 세포고사

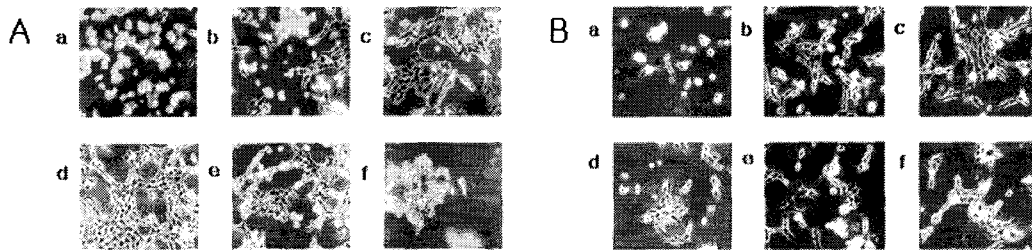


Fig. 2. Effect of RVSE (A) or fisetin (B) on the morphological changes in NIH3T3 cells exposed to UVB. Cells were exposed to 200 J/m² UVB light and incubated for 48 h with growth medium or medium containing various concentrations of RVSE (Panel A. a, 0 µg/ml; b, 50 µg/ml; c, 100 µg/ml; d, 200 µg/ml; e, 300 µg/ml; f, 400 µg/ml) or fisetin (Panel B. a, 0 µM; b, 50 µM; c, 75 µM; d, 100 µM; e, 300 µM; f, 500 µM). Original magnification, ×200. The data represent a typical result of three similar experiments.

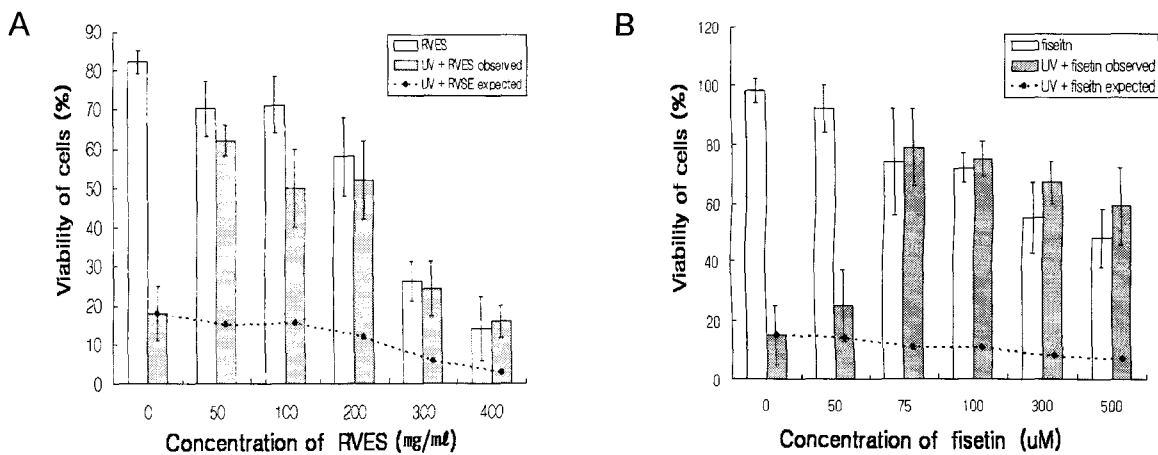


Fig. 3. Effect of RVSE (A) or fisetin (B) on the viability of NIH3T3 cells exposed to UVB. Cells exposed (grey bars) or not (white bars) to UVB were incubated for 48 h with various concentrations of RVSE or fisetin and then processed for trypan blue exclusion assay. Each data point represents the mean ±SD of triplicate experiments. Dashed lines represent the expected values when the effects of UV and RVSE, or the effects of UV and fisetin are independent.

가 RVSE와 fisetin에 의해 저해되는 것인지 아니면 단순히 생존율만을 증가시키는 것인지를 알아보기 위해 세포고사가 진행될 때 나타나는 핵의 분절 현상을 관찰할 수 있는 DAPI 염색 분석을 수행하였다(Fig. 4A와 B). 세포에 UVB를 조사한 후 배양배지만을 처리한 그룹(Fig. 4A와 B의 e)은 세포고사의 특징적인 핵의 분절이 뚜렷이 관찰되었다. 그러나 세포에 UVB를 조사한 후 RVSE와 fisetin을 농도별 첨가하여 48시간 처리한 그룹(Fig. 4A와 B의 f-h)에서는 핵의 분절이 현저히 감소되었는데 반복적인 관찰을 통해 처리하였을 때 약 35-45% 정도의 감소를 보였다(자료제시 않았음). 이는 RVSE와 fisetin이 UVB에 의한 NIH3T3 세포의 세포고사를 저해함을 시사한다.

자외선에 의해 유발된 세포고사의 초기 단계에 대한 RVSE와 fisetin의 효과

RVSE와 fisetin이 세포고사의 초기 단계의 진행을 방어하여 감소시키는지를 규명하기 위해 이를 확인할 수 있는 Annexin V 결합분석(Fig. 5A와 B)을 수행하였다. 세포에 UVB를 조사한 후 RVSE와 fisetin을 농도별로 첨가하여 48시간 반응시킨 그룹(Fig. 5A와 B의 f-h)에서는 Annexin V가 결합

하는 현상이 감소하는 것을 보였다. 이는 RVSE와 fisetin이 NIH3T3 세포에 UVB를 조사함으로써 생기는 세포고사의 진행과정 중 특히 초기 단계를 저해 또는 감소하는 효과를 가지고 있음을 시사한다.

고 찰

전통적으로 옷나무 성분은 한방에서와 민간에서 모두 유용하게 사용되었다. 최근에는 옷 성분의 다양한 생물학적 기작에 대해보고 되었다. 옷 성분이 암세포의 증식을 막는 효과가 있다고 보고되었고[7], 아울러 항산화 작용, 항암 작용 그리고 면역능 증진작용을 가지고 있다고 보고되었다[3,22].

자외선, 특히 290-320 nm의 파장을 지닌 UVB는 우리 주위환경에 존재하며 UVB에 의해 유도되는 생물학적인 반응에는 세포주기 정지, 세포고사, 세포증식 그리고 어린피부세포의 노화 등이 포함되며, 대부분의 포유동물세포는 UVB와 같은 상해원에 지속적으로 노출될 때 종양의 발달을 유도한다[17,18,21].

본 연구에서는 NIH3T3 세포에서 DNA 상해반응에 미치는 옷나무 추출물(RVSE)과 옷나무 추출물 분리 성분인 fisetin

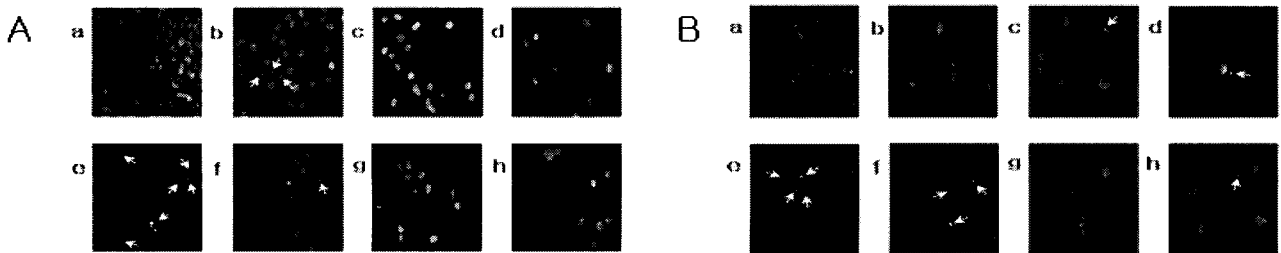


Fig. 4. Protective effect of RVSE (A) and fisetin (B) on the UVB-induced nuclear fragmentation in NIH3T3 cells. Cells were exposed to 200 J/m² UVB light (e-h) or not (a-d) and then incubated for 48 h with growth medium containing various concentrations of RVSE (Panel A. a and e, 0 µg/ml; b and f, 100 µg/ml; c and g, 200 µg/ml; d and h, 300 µg/ml) or fisetin (Panel B. a and e, 0 µM; b and f, 50 µM; c and g, 100 µM; d and h, 300 µM) followed by DAPI staining. Arrows indicate the presence of cells with typical apoptotic nuclear fragmentation. The data represent a typical result of three similar experiments.

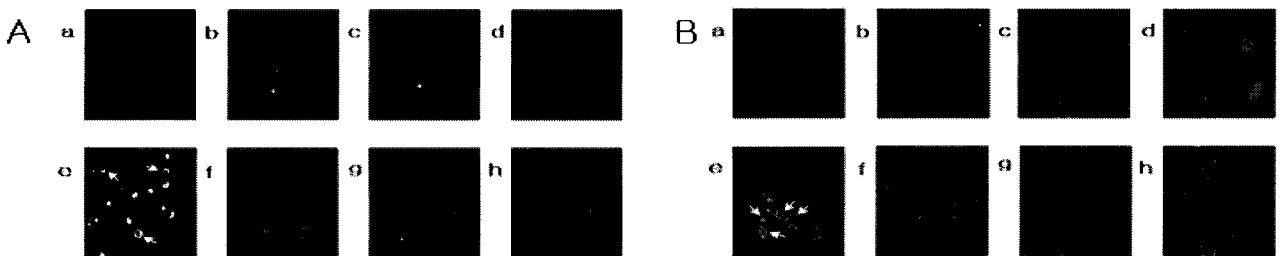


Fig. 5. Effect of RVSE (A) and fisetin (B) on the early apoptosis of UVB-exposed NIH3T3 cells as determined by Annexin V binding assay. Cells were exposed to 200 J/m² UVB light (e-h) or not (a-d) and then incubated for 48 h with growth medium containing various concentrations of RVSE (Panel A. a and e, 0 µg/ml; b and f, 100 µg/ml; c and g, 200 µg/ml; d and h, 300 µg/ml) or fisetin (Panel B. a and e, 0 µM; b and f, 50 µM; c and g, 100 µM; d and h, 300 µM). Arrows indicate the presence of cells with typical early apoptotic cells. The data represent a typical result of three similar experiments.

효과에 대해서 실험하였다. RVSE와 fisetin을 다양한 농도별로 배양배지에 첨가하여 trypan blue 배제분석으로 생존율을 관찰한 결과 고농도를 첨가한 그룹에서만 세포독성에 의한 생존율 감소를 보여 주었고 대체적으로 생존율의 변화는 관찰되지 않았다(white bars in Figs. 3A-B). UVB에 조사한 후 RVSE와 fisetin을 다양한 농도별로 배양배지에 첨가하여 처리한 그룹의 세포의 생존율 변화, 세포의 형태변화, 핵의 쪼개짐, 세포막 구조변화에 Annexin V가 결합하는 현상이 UVB에 조사 되지 않고 RVSE와 fisetin을 다양한 농도별로 배양배지에 첨가하여 처리한 그룹과 비슷한 결과를 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 세포형태분석, trypan blue 배제분석, DAPI 염색에 의한 핵 분절 분석, Annexin V 결합분석과 같은 다양한 분석법들을 통해 증명되었다. 이상의 결과들은 UVB에 의한 세포고사, 특히 초기단계를 RVSE와 fisetin이 저해하고 보호해주는 효과가 있음을 시사한다.

DNA 상해에 의한 세포고사에 의해 발현하게 되는 단백질에는 p53, Bax, Mdm2, Gadd45이 포함되고 DNA 회복과 연관 있는 단백질은 PCNA, 세포주기와 연관 있는 단백질은 cyclin A, cyclin D, cdk2, cdk4가 발현하게 된다[14]. p53 단백질은 자외선과 같은 DNA 상해가 일어난 후 세포주기를 조절해 주는 중요한 단백질로[10], 유전독성에 의해 활성화 되고 발현율이 증가한다[25]. 세포주기를 정지하거나 세포고사를 진행하는데 있어서 필요한 p53 단백질은 핵 안에 안정화된 p53 단백질이 축적 되어야 그 기능을 한다고 알려져 있다[23].

Fisetin과 같은 플라보노이드 성분의 생물학적 효과는 다양하고 어떤 경우에는 세포에 따라 상반된 결과를 보이기도 한다. 예를 들어 플라보노이드들은 B16과 같은 melanoma의 세포 성장을 억제하며 세포고사를 유도한다[7]. 이와 유사하게 플라보노이드 중의 하나인 silibinin은 UVB에 의한 피부 종양으로부터 보호하는 효과가 있다고 보고되었는데, 그 효과에 대한 분자 기작은 silibinin이 자외선 상해시 활성화되는 p53의 수준을 증가시키고, 그로 인해 p21^{WAF1}이 활성화되며 그 p21^{WAF1}은 PCNA와 DNA 합성을 저해시켜 결국은 세포의 증식을 저해시키고 UVB에 의한 피부종양을 억제한다고 제시되었다[15]. 한편, 윗추출물과 그 성분중 하나인 quercetin과 같은 플라보노이드는 항산화 활성과 면역세포의 세포고사를 감소시키는 능력이 있음이 보고되고 있는데[12,13], 이러한 보고는 본 연구의 결과와 유사한 측면을 갖는다. 현재 자외선에 의해 유발된 p53의 수준이 fisetin 처리에 의해 변화됨이 본 연구자 등에 의해 관찰되고 있는데, 보다 정확한 fisetin의 기작을 향후의 연구에서 더 규명해 가고자 한다.

감사의 글

이 논문은 원광대학교 2003년도 교비연구지원에 의하여 연구되었음

참고 문헌

1. Dashwood, R. and D. Guo. 1993. Antimutagenic potency of chlorophyllin in the Salmonella assay and its correlation with binding constants of mutagen-inhibitors complex. *Environ. Mol. Mutagenesis*. **22**, 164-171
2. Guengerich, F. P. 1989. Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **48**, 2946-2954.
3. Harborne, J. B. and C. A. Williams. 2000. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
4. Hayatsu, H., N. Inada, T. Kakutani, S. Arimoto, T. Negishi, K. Mori, T. Okuda and I. Sakata. 1992. Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. *Prevent. Med.* **21**, 370-376.
5. Hwang, S. J., J. Y. Cha, S. G. Park, G. J. Joe, H. M. Kim, H. B. Moon, S. J. Jeong, J. S. Lee, D. H. Shin, S. R. Ko and J. K. Park. 2002. Diol and triol type ginseng saponins potentiate the apoptosis of NIH3T3 cells exposed to MMS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **181**, 192-202
6. Hwang, S. J., J. S. Lee, B. H. Jeon, W. S. Kim, E. R. Woo and J. K. Park. 2002. Extracts of *Caesalpinia sappan* L potentiate the apoptosis of NIH3T3 cells exposed to MMS. *Kor. J. Life Sci.* **12**, 182-187
7. Iwashita, K., M. Kobori, K. Yamaki and T. Tsushida. 2000. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1813-1820.
8. Jung, N. C. 1998. Biological activity of urushiol and flavonoids from Lactree (*Rhus verniciflua* Stokes). Ph.D. thesis, Chonnam National University, Kwang-ju, South Korea.
9. Kadekaro, A. L., R. J. Kavanagh, K. Wakamatsu, S. Ito, M. A. Pipitone and Z. A. Abdel-Malek. 2003. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: Who will win the final round? *Pigment Cell Res.* **16**, 434-447.
10. Kawagishi, N., Y. Hashimoto, H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto and H. Iizuka. 1998. Epidermal cell kinetics of pig skin in vivo following UVB is enhanced in hyperproliferative skin condition. *J. Dermatol. Sci.* **18**, 43-53.
11. Lee, J. C., H. Y. Jung and K. T. Lim. 1999. Effects of *Rhus verniciflua* stokes (RVS) on the plasma level of cholesterol and tumor growth in mouse. *J. Toxicol. Pub. Health.* **15**, 169-175.
12. Lee, J. C., K. T. Lim, Y. S. Jang. 2002. Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. *Biochim. et Biophys. Acta* **1570**, 181-191.
13. Lee, J. C., J. Kim, J. K. Park, G. H. Chung, Y. S. Jang. 2003. The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Exp. Cell Res.* **291**, 386-397.
14. Li, Y., M. Chopp, C. Powers and N. Jiang. 1997. Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res.* **765**, 301-312.

15. Mallikarjuna, G., S. Dhanalakshmi, R. P. Singh, C. Agarwal and R. Agarwal. 2004. Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling. *Cancer Res.* **64**, 6349-6356.
16. McGowan, C. H. and P. Russell. 2004. The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 629-633.
17. Ichihashi, M. M. Ueda, A. Budiyo, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru and T. Horikawa. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology* **189**, 21-39.
18. Matsumura, Y. and H. N. Ananthaswamy. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 298-308.
19. Nishiwaki, Y., N. Kobayashi, K. Imoto, T. Iwamoto, A. Yamamoto, S. Katsumi, T. Shirai, S. Sugiura, Y. Nakamura, A. Sarasin, S. Miyagawa and T. Mori. 2004. Trichothiodystrophy fibroblasts are deficient in the repair of ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 526-532.
20. Otsu, E., T. Yagi, T. Mori, T. Matsunaga, O. Nikaido, S. T. Kim, K. Hitomi, M. Ikenaga and T. Todo. 2000. Respective roles of cyclobutane pyrimidine dimers, (6-4) photoproducts, and minor photoproducts in ultraviolet mutagenesis of repair-deficient xeroderma pigmentosum A cells. *Cancer Res.* **60**, 1729-1735.
21. Ouhitit, A., H. K. Muller, D. W. Davis, S. E. Ullrich, D. McConkey and H. N. Ananthaswamy. 2000. Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. *Am. J. Pathol.* **156**, 201-207.
22. Read, M. A. 1995. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agent. *Am. J. Pathol.* **147**, 235-237.
23. Renton, A., S. Llanos and X. Lu, 2003. Hypoxia induces p53 through a pathway distinct from most DNA-damaging and stress-inducing agents. *Carcinogenesis* **24**, 1177-1182.
24. Wu, C. H. and G. C. Yen. 2004. Antigenotoxic properties of *Cassia* tea (*Cassia tora* L.): Mechanism of action and the influence of roasting process. *Life Science* **76**, 85-101
25. Xu, J. and Morris, G. F. (1999). p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation. *Mol. Cell. Biology.* **19**, 12-20.
26. Yen, G. C., D. Y. Chuang and C. H. Wu. 2002. Free radicals in foods: Chemistry, nutrition and health effects. In: Morello, M. J., F. Shahidi, and C. T. Ho (Eds), ACS Symposium Series No. 807, Washington DC, pp. 201 - 212
27. Zhou, B. B. S. and S. J. Elledge. 2000. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439.
28. 김태정. 1996. 한국의 자원식물(II). pp. 292-294. 서울대학교 출판부.
29. 최영진. 1992. 한국민속식물. pp. 247-248. 아카데미.