

대황 추출물의 항산화 활성 및 MMP-1 저해 활성

박성민 · 이계원¹ · 조영호^{1*}

(주)코씨드바이오팜 기술연구소, ¹건양대학교 제약공학과

Received August 29, 2008 / Accepted November 19, 2008

Effect of *Rheum undulatum* Extract on Antioxidant Activity and Activity of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Skin Fibroblasts. Sung Min Park, Gye Won Lee¹ and Young Ho Cho^{1*}. R&D Center, CoSeedBioPharm Corporation, Chungbuk 363-792, Korea, ¹Department of Pharmaceutical Engineering, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea - *Rheum undulatum* L. has been commonly used as a cure for hematemesis, dropsy, and haematuria in the Oriental medicine for a long time. The main constituents of *R. undulatum* are chrysophanol and emodin, which are an antioxidative substance that has an anthraquinone structure. In the present study, to develop a new anti-aging agent, we examined the antioxidant activity and the inhibitory effect of the *R. undulatum* extract on the synthesis of MMP-1 in UVA-irradiated human dermal fibroblasts and MMP-1 activity. The *R. undulatum* extract was found to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system by a dose-dependent manner, respectively. UVA-induced MMP-1 expression was reduced about 79.5% by 1 µg/ml of the *R. undulatum* extract and also inhibited MMP-1 activity in a dose-dependent manner. In conclusion, it was observed that the *R. undulatum* extract has the antioxidant activity, regulation of UVA-induced MMP-1 production, and inhibition of MMP-1 activity. Therefore, these results suggest that the *R. undulatum* extract can be developed as a new anti-aging component of cosmetics.

Key words : *Rheum undulatum* L., emodin, antioxidant, MMP-1 inhibition

서 론

피부 노화에 영향을 미치는 외부 인자로는 기후, 흡연, 공해, 자외선 등이 있으며, 특히 자외선에 의한 노화를 광노화(photoaging)라고 한다. 자외선은 피부 세포 내에 유해한 활성 산소종(reactive oxygen species)을 생성시키고, 이 활성 산소종은 피부 세포에서 불포화 지방산, 단백질, DNA 등의 고분자 물질들과 반응하여 피부 콜라겐 등의 결합조직 형성 파괴, 세포막 기능저해, DNA 변이축진, 단백질 작용변형 등을 유발하므로 피부 노화와 매우 밀접한 관계를 가지는 것으로 알려져 있다[3,6,14].

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 활성 중심부에 아연을 갖는 금속 단백질 분해효소로서 현재까지 약 20 여종 이상의 종류가 있는 것으로 알려져 있다[12]. 특히 MMPs는 피부의 각질형성세포(keratinocytes), 섬유아세포(fibroblasts)를 비롯한 많은 세포들로부터 분비되어 지지 구조체인 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)과 기저막(basement membrane, BM)을 구성하는 주요 단백질 구성요소들을 가수분해함으로써 피부 탄력을 유지하는 결합조직을 파괴하여 주름과 탄력저하 및 피부 처짐의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[20]. Brenneisen 등[2]은 자외선 조사와 활성 산소종에 의

해 피부내의 MMPs 활성이 증가되어 진피층 내의 콜라겐 등과 같은 세포 외 기질들의 붕괴에 영향을 미치며, MMPs가 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다.

생약제인 대황(*Rheum undulatum* L.)은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 뿌리는 비대하고 황색이며, 줄기는 높이 1.5 m 정도로 자란다. 이 뿌리를 가을에 채취하여 건조시켜 약재로 사용한다. 일반적으로 토혈, 수종, 혈뇨를 치료하는데 사용되며 그 밖에 해열과 변비에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 대황의 주성분으로는 chrysophanol, emodin 등의 anthraquinone 유도체와 수종의 glucoside 화합물이 보고되었다[18,19].

본 연구에서는 대황 추출물의 항산화 효과와 MMP-1의 활성 저해 효과 및 자외선 A에 의한 사람 피부 섬유아세포(human dermal fibroblasts, HDF)에서 MMP-1 생성 억제효과 등을 관찰하였고, 기능성 화장품의 천연 항노화 소재로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 제조

본 실험에서 사용한 대황(*Rheum undulatum* L.)은 서울 경동시장 내의 한약 건재상에서 구입하여 사용하였다. 건조된 대황을 분쇄하여 70% 에탄올을 넣은 후 3시간씩 3회 환류 추출하였다. 추출물을 여과하고 감압 농축한 다음 동결 건조

*Corresponding author

Tel : +82-41-730-5695, Fax : +82-41-730-5695

E-mail : micael@konyang.ac.kr

하여 그 분말을 사용하였다.

세포 및 시약

신생아의 포피조직에서 분리한 사람 피부 섬유아세포는 Modern Tissue Technology사(Korea)로부터 구입하였다. 구입한 사람 피부 섬유아세포를 DMEM/F12 (3:1) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6-10 세대 세포를 실험에 이용하였다. MMP-1 정량을 위해 MMP-1 Biotrok™ ELISA system (Amersham, UK)을 구입하여 사용하였다. *In vitro* MMP-1 활성 저해효과 측정을 위해 사용된 형광물질이 표지된 DQ gelatin, DQ collagen, collagenase, 1,10-phenanthroline은 Molecular probe사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약들은 일급 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

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

Free radical의 소거 작용은 Blois [1]가 사용한 방법을 약간 변형하여 각 시료의 DPPH radical (Aldrich, USA)에 대한 소거효과를 측정하였다. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 비교하여 DPPH radical의 소거활성을 백분율로 나타내었다. 양성 대조그룹으로는 vitamin C를 사용하였으며, 농도별로 처리하여 DPPH radical을 50% 소거하는 농도(SC₅₀)를 구하여 시료와 활성을 비교하였다.

초산화 음이온 라디칼(Superoxide anion radical) 소거 효과 측정

초산화 음이온 라디칼의 소거작용은 Furuno 등[7]의 방법에 따라 각 시료의 xanthine-xanthine oxidase system에 의해 생성된 초산화 음이온 라디칼을 소거하는 효과를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃ buffer에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM nitroblue tetrazolium (NBT), 0.15% bovine serum albumin (BSA) 용액과 시료를 각각 첨가하여 혼합한 다음, 25°C에서 10분간 반응하였다. 그 후 각 tube에 xanthine oxidase (0.25 U/ml) 용액을 첨가하여 25°C에서 30분간 반응한 후, 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 비교하여 초산화 음이온 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었다. 양성 대조그룹으로는 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)를 사용하였으며, 농도별로 처리하여 초산화 음이온 라디칼을 50% 소거하는 농도(SC₅₀)를 구하여 시료와 활성을 비교하였다.

세포 생존율 측정

세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann [16]의 방법을 변형하여 실시하였다. HDF를 2×10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 투여하여 CO₂ 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)을 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 micro plate reader (BIO-TEK Instruments, USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

자외선 A 조사 및 시료의 처리

사람 피부 섬유아세포를 1.5×10⁵ cells/ml의 농도로 직경 35 mm dish에 약 80% 정도자랄 때까지 배양하였다. 자외선 조사 전에 원배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지 내 혈청 성분을 제거한 다음, 자외선 조사장치(Sankyo Denki, Japan)로 자외선 A (6.3 J/cm²)를 조사하였다. 자외선 A 조사 후 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3:1) 배지에 시료를 투여하여 24시간 배양하였다.

MMP-1 합성 저해 효과 측정

UVA 조사에 의해 유도되는 MMP-1 합성량 측정은 MMP-1 Biotrok™ ELISA kit (UK)를 이용한 enzyme linked immunosorbent assay 방법으로 실시하였다. 먼저 사람 피부 섬유아세포에 자외선 A를 조사 후 시료를 처리하여 24시간 배양한 배지를 MMP-1에 대한 단클론 항체(monoclonal anti-MMP-1)로 coating된 microplate의 각 well에 100 µl씩 분주한 후, 뚜껑을 덮어 실온(20-25°C)에서 2시간 동안 보온하였다. 각 well의 내용물을 제거한 후 세척용 완충제(wash buffer)로 세척과정을 4회 반복하였다. 세척액을 완전히 제거한 다음 각 well에 MMP-1에 대한 다클론 항체(polyclonal anti-MMP-1) 100 µl씩 분주한 후, 뚜껑을 덮어 실온에서 2시간 동안 보온하였다. 각 well의 내용물을 제거한 후 세척용 완충제의 세척과정을 4회 반복하였으며, 세척액을 완전히 제거한 후 각 well에 peroxidase conjugate 100 µl씩 분주한 후 실온에서 1시간 동안 보온하였다. 보온이 끝난 후 세척용 완충제의 세척과정을 4회 반복하였으며, 희석된 기질(substrate) 용액을 각 well에 100 µl씩 분주한 후 실온에서 30분간 보온하였다. Stop 용액을 각 well에 100 µl씩 넣고 30분 내에 micro plate reader (USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 표준에 대한 시료의 농도를 산출하였다.

MMP-1 활성 저해 효과 측정

시료의 MMP-1 활성 저해 효과 측정은 Wang 등[20]이 사용한 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 즉, 반응완충액 100 µl에

DQ collagen (0.25 mg/ml) 20 μ l, 시료 40 μ l와 collagenase (0.5 unit) 40 μ l를 첨가하였다. 암소, 실온에서 20분 경과 후 형광분광광도계(PERKIN ELMER, USA)를 이용하여 흡수파장 495 nm, 방출파장 515 nm로 형광값을 측정하였고, 대조그룹으로서 효소액 대신 반응 완충액을 효소와 동량 첨가하여 형광값을 측정하였다. 시료 자체의 형광값도 측정하여 효소활성 계산시 보정하였다. 양성 대조그룹으로는 1,10-PT를 사용하였으며, 농도별로 처리하여 MMP-1 활성을 50% 소거하는 농도(IC₅₀)를 구하여 시료와 비교하였다.

자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성 검정은 Student's t-test로 실시하였으며, p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

DPPH radical 소거 효과

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고, 지질과산화의 초기반응의 억제 정도를 예측할 수 있다. 대황 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정한 결과 vitamin C는 11 μ g/ml에서 50%의 DPPH radical을 소거하였으며, 대황 추출물은 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈다(Fig. 1). 즉, 대황 추출물을 5, 10, 20 μ g/ml의 농도로 처리한 경우 각각의 DPPH radical 소거능은 22%, 65%, 72%로 나타났다. Oh 등[17]은 대황 뿌리로부터 분리한 piceatannol이 DPPH radical 소거활성과 지질과산화 억제활성이 높다고 보고하였고, Jung 등[9]은 결명자

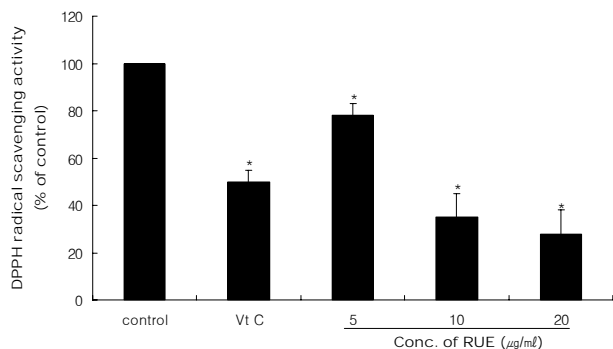


Fig. 1. Scavenging effects of *Rheum undulatum* extract (RUE) on DPPH radicals. A solution of 150 μ l of 100 μ M DPPH solution in methanol was gently mixed with 150 μ l of RUE for 10 min and the absorbance was measured at 565 nm. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. The SC₅₀ of vitamin C showed 11 μ g/ml. * $p < 0.05$ compared with control.

로부터 분리한 alternin과 emodin이 hydroxyl radical 소거능이 있다고 보고하였다. 본 실험에서는 대황 추출물의 free radical 소거효과가 단일 성분인 비타민 C에 뒤지지 않는 매우 우수한 효과를 가지는 것으로 밝혀졌다.

초산화 음이온 라디칼(Superoxide anion radical) 소거 효과

피부 노화에 중요한 영향인자는 자외선에 의해 비정상적으로 생성량이 증가하는 활성 산소종과 자유 라디칼이다. 유해 산소라 불리는 활성 산소종은 세포 생체막의 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화지질을 축적함으로써 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있으며 [10], 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되어 있다[8,15]. 초산화 음이온 라디칼의 저해작용은 초산화 음이온 라디칼 소거작용과 xanthine oxidase의 효소활성 저해에 의해 나타난다고 보고되었다[13]. 대황 추출물의 xanthine oxidase에 의해 생성되는 초산화 음이온 라디칼의 소거 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 양성 대조그룹으로 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)를 이용하여 대황 추출물의 초산화 음이온 라디칼 소거효과를 비교하였다. 그 결과 대황 추출물은 투여 농도 의존적으로 초산화 음이온 라디칼 소거작용을 나타내 5, 10, 20 μ g/ml의 농도로 처리한 경우, 각각의 초산화 음이온 라디칼 소거능은 25%, 60%, 80%로 우수한 초산화 음이온 라디칼 소거효과를 나타내었다. 양성 대조그룹인 BHA는 32 μ g/ml에서 50%의 초산화 음이온 라디칼을 소거하였다. 상기의 결과로 볼 때 대황 추출물은 양성 대조그룹인 BHA보다 우수한 초산화 음이온 라디칼 소거능을 가지는 것으로 밝혀졌다.

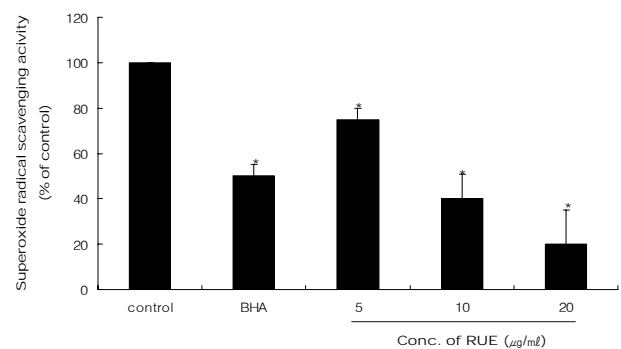


Fig. 2. Scavenging effects of *Rheum undulatum* extract (RUE) on superoxide radicals. Superoxide radicals were generated by a xanthine/xanthine oxidase system and measured by NBT reduction method as described in the Materials and Methods. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. The SC₅₀ of BHA showed 32 μ g/ml. * $p < 0.05$ compared with control.

세포 독성

대황 추출물이 사람 피부 섬유아세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대황 추출물을 다양한 농도로 처리하고 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 대황 추출물을 최고 1,000 µg/ml 처리 시에도 세포 생존율이 90% 이상으로 나타났으며, 그 이상의 농도부터는 서서히 생존율이 저하되는 경향을 보였다. 따라서 대황 추출물 1,000 µg/ml 이하 범위에서는 세포독성이 거의 없는 것으로 사료되어 이 농도 범위를 기준으로 실험을 실시하였다.

UVA에 의한 MMP-1 합성 저해 효과

피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 AP-1의 활성도가 증가되는 신호 전달 경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다[5]. 이러한 자외선 A에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 대황 추출물이 미치는 영향을 알아보고자 사람 피부 섬유아세포에 자외선을 조사하고, 대황 추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 MMP-1의 합성량을 측정하였다. 그 결과 대황 추출물은 농도 의존적으로 MMP-1 합성 저해 효과를 나타내었다(Fig. 4). 즉, 대황 추출물을 0.25, 0.5, 1 µg/ml의 농도로 처리한 경우 MMP-1의 합성 저해 효과는 63.0%, 72.6%, 79.5%로 나타났다. 본 실험에서 대황 추출물은 사람 피부 섬유아세포에서 자외선 A에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 합성을 저해하는 효과가 있음이 확인되었으며, 이는 기존에 보고된 retinoic acid [4]보다 우수한 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 또한, Kochanek 등[11]과 Wlaschek 등[21]은 사람 피부 섬유아세포에서 자외선 A에 의해 활성 산소종이 생성되며, 활성 산소종으로 인한 MMP의 발현이 촉진된다고 보고하였으며, 본 실험의 결과로 볼 때 대황 추출물은

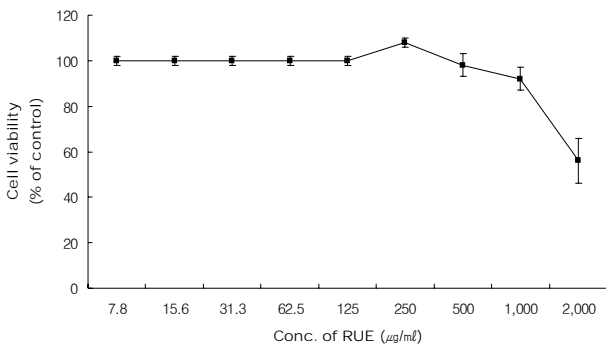


Fig. 3. Effect of *Rheum undulatum* extract (RUE) on the cell viability of human dermal fibroblasts. HDF cells were treated with various concentration of RUE at 37°C for 24 hr. The proportion of survival cells was measured by MTT assay. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. * $p < 0.05$ compared with control.

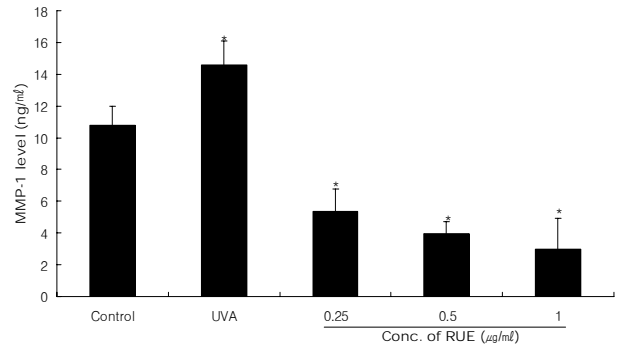


Fig. 4. Effect of *Rheum undulatum* extract (RUE) on the production of MMP-1 in UV irradiated human dermal fibroblasts. The cells were treated with various concentration of RUE for 24 hr. The contents of MMP-1 in culture media were determined by the MMP-1 Biotrack™ ELISA kit as detailed under the Materials and Methods. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. * $p < 0.05$ compared with UVA-irradiated control.

활성 산소종 소거작용을 통하여 MMP-1 합성을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

MMP-1 활성 저해 효과

피부세포의 결합조직을 구성하는 성분들 가운데 콜라겐은 피부 건조증량의 약 90%에 달하는 주요 구성 단백질이다. 따라서 콜라겐의 분해는 곧 결합조직의 탄력 저하와 피부의 주름 및 처짐에 직접적인 영향을 미친다. 체내에서 생성되는 수십종의 MMPs 가운데 MMP-1은 콜라겐에 특이적으로 작용하는 단백질 분해효소(proteinase)로서 MMP-1의 활성을 억제하여

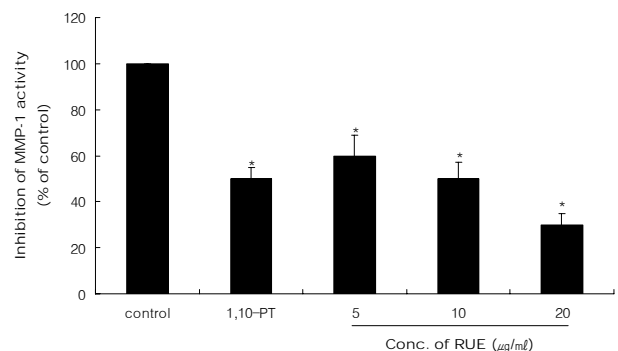


Fig. 5. Inhibitory effect of *Rheum undulatum* extract (RUE) on MMP-1 activity. A solution of 20 µl of DQ collagen (0.25 mg/ml) and 40 µl of RUE were gently mixed with 40 µl of 0.5 U collagenase for 20 min and the luminescence was measured at 495 nm (excitation wavelength) and 515 nm (emission wavelength). The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. The IC₅₀ of 1,10-PT showed 11 µg/ml. * $p < 0.05$ compared with control.

콜라겐을 보호하면 피부조직의 탄력을 유지하고 주름의 생성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다[12]. 따라서 대황 추출물의 MMP-1 활성 저해 효과를 양성 대조그룹으로 MMP-1 활성 저해 작용이 있는 것으로 알려진 1,10-phenanthroline [20]을 이용하여 비교하였다. 그 결과 1,10-phenanthroline는 24 µg/ml에서 50%의 MMP-1의 활성을 저해하였으며, 대황 추출물의 경우 투여 농도 의존적으로 MMP-1의 활성을 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 즉, 대황 추출물을 5, 10, 20 µg/ml의 농도로 처리한 경우 MMP-1의 활성을 각각 40%, 50%, 70% 저해하는 것으로 나타났으며, IC₅₀은 10 µg/ml로 우수한 MMP-1 활성 저해 효과를 나타내었다. 상기의 결과로 볼 때 대황 추출물은 양성 대조그룹인 1,10-phenanthroline보다 약 2.4배 정도 높은 MMP-1 활성 저해능을 가지는 것으로 밝혀졌다.

요 약

본 연구에서는 대황 추출물에 의한 항산화 효과, MMP-1 활성 저해효과 및 자외선이 조사된 사람 피부 섬유아세포에서 MMP-1 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 대황 추출물의 DPPH radicals과 초산소 음이온 라디칼 소거효과는 농도 의존적인 경향을 나타내었으며, DPPH와 초산소 음이온 라디칼을 각각 20 µg/ml에서 72%와 80% 정도 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 자외선이 조사된 사람 피부 섬유아세포에서 MMP-1의 발현 저해효과 측정에서 대황 추출물은 1 µg/ml에서 약 79.5%로 매우 우수한 활성 저해효과를 나타내었다. 또한 대황 추출물의 MMP-1 활성 저해효과는 20 µg/ml에서 약 70%의 우수한 활성 저해효과를 나타내었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 대황 추출물은 항산화 효과 및 MMP-1 활성 저해효과와 자외선에 의한 MMP-1의 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 보아 우수한 항노화 소재로써 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
2. Brenneisen, P., H. Sies and K. Scharffetter-Kochanek. 2002. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **973**, 31-43.
3. Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 79-110.
4. Cho, Y. H., G. S. Sim, J. H. Kim, S. M. Park, B. C. Lee, H. B. Pyo, Y. P. Yun and H. D. Park. 2004. Effect of *Melothria heterophylla* extract on expression of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *Yakhak Hoeji.* **48**, 358-363.
5. Chung, J. H., S. W. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher and

- J. J. Voorhees. 2000. Decreased extracellular-signal regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 177-182.
6. Davies, K. J. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **262**, 9914-9920.
7. Furuno, K., T. Akasako and N. Sugihara. 2002. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 19-23.
8. Hatano, T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *Natural Medicines* **49**, 357-363.
9. Jung, H. A., H. Y. Chung, T. Yokozawa, S. K. Kim and J. S. Choi. 2004. Alaternin and emodin with hydroxyl radical inhibitory and/or scavenging activities and hepatoprotective activity on tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 947-953.
10. Kitahara, A., U. Matsumoto, H. Ueda and R. Ueoka. 1992. A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of γ -irradiated methyl linolate. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2208-2209.
11. Kochanek, S. K., M. Wlaschek, K. Briviba and H. Sies. 1993. Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblast. *FEBS Lett.* **331**, 304-306.
12. Kondo, S. 2000. The roles of cytokines in photoaging. *J. Dermatol. Sci.* **23**, S30-S36.
13. Kuppusamy, P. and J. L. Zweier. 1989. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**, 9880-9884.
14. Lavker, R. M. and A. M. Kligman. 1988. Chronic heliodermatitis: a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *J. Invest. Dermatol.* **90**, 325-330.
15. Masaki, H., S. Sakaki, T. Atsumi and H. Sakurai. 1995. Active oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162-166.
16. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-59.
17. Oh, S. J., N. I. Beak and H. Y. Kim. 2001. Piceatannol, Antioxidant compound isolated from the root of *Rheum undulatum* L. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 208-210.
18. Park, J. H. 2002. The Encyclopedia of Chinese Crude Drugs. Shinilbooks Publications, Seoul, pp. 180-184.
19. Shah, C. S., J. S. Qadry and J. G. Bhatt. 1972. Qualitative and quantitative evaluation of anthraquinone derivatives in Indian thubarb. *Plant Med.* **22**, 103-108.
20. Wang, Y., A. R. Johnson, Q. Z. Ye and R. D. Dyer. 1999. Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 33043-33049.
21. Wlaschek, M., K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies and K. Scharffetter-Kochanek. 1995. Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 194-198.