

사람의 섬유아세포 엘라스타제 활성에 대한 탄닌산의 억제 효과

이 주 은 · 김 소 영 · 김 수 연 · 오 미 희 · 윤 혜 영 · 백 광 진 · 권 년 수 · 김 동 석[†]

중앙대학교 의과대학 생화학교실
(2008년 9월 3일 접수, 2008년 9월 12일 채택)

Inhibitory Effects of Tannic acid on Human Skin Fibroblast Elastase Activity

Ju Eun Lee, So Young Kim, Su Yeon Kim, Mi Hee Oh, Hye Young Yun, Kwang Jin Baek,
Nyoun Soo Kwon, and Dong Seok Kim[†]

Department of Biochemistry, College of Medicine, Chung-Ang University, 221 Heukseok-dong,
Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

(Received September 3, 2008; Accepted September 12, 2008)

요 약: 피부에서 엘라스틴(elastin)은 중요한 탄력섬유의 구성성분 중의 하나이다. 피부주름(skin wrinkle) 형성은 콜라겐(collagen)의 합성과 분해가 중요한 요인으로 작용한다고 알려져 있지만, 최근 많은 연구에서 엘라스틴의 재형성과 분해 또한 주름형성 기전에서 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 엘라스타제(elastase)는 엘라스틴을 분해하는 일종의 메탈로프로테이나제(metalloproteinase)이며, 자외선 B (ultraviolet B, UVB) 조사 후에 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 증가된 엘라스타제의 활성은 피부의 탄력성 감소와 주름 형성의 주요한 원인이 될 것이다. 본 연구에서는 항산화 효과가 있으며, 각종 견과류나 과일에 함유된 폴리페놀(polyphenol) 성분인 탄닌산(tannic acid)을 사람의 섬유아세포(CCD-25Sk fibroblasts)에 처리하여 엘라스타제 활성과 트로포엘라스틴 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 탄닌산은 농도의존적으로 사람의 섬유아세포 엘라스타제 활성을 유의성 있게 억제시켰다. 그러나 트로포엘라스틴 합성이나 발현증가에는 유의성 있는 효과를 보이지 않았다. 이러한 결과들로부터 탄닌산은 엘라스타제의 활성을 억제시켜 엘라스틴의 3차원적 구조를 유지하는데 기여하는 것으로 사료된다. 따라서 탄닌산은 주름생성을 억제하는 물질로 개발 가능할 것으로 기대된다.

Abstract: Elastin is an important component of elastic fibers in the skin. Recently, many studies have reported that elastin is also involved in inhibiting or repairing wrinkle formation, although collagen is a major factor in the skin wrinkle formation. Elastase is a metalloproteinase which acts on degradation of elastin. It is known that elastase activity is increased by ultraviolet (UV) B radiation. Thus, increased elastase activity could be the major reason for skin elasticity reduction and wrinkle formation. Tannic acid is a polyphenol found in various fruits and nuts. This molecule has a potent ability to eliminate reactive oxygen species and reactive nitrogen species. In the present study, we investigated whether tannic acid has effects on elastase activity and tropoelastin synthesis. Our results showed that tannic acid reduced elastase activity significantly in a dose-dependent manner. However, the expression of tropoelastin protein and mRNA was not significantly affected by tannic acid. From these results, we suggest that tannic acid may contribute to block tortuosity of elastic fibers by inhibiting elastase. Thus, tannic acid might be developed for a possible agent to inhibit skin aging.

Keywords: human fibroblast, elastase, elastin, tannic acid, tropoelastin

[†] 주 저자 (e-mail: ds_kim@cau.ac.kr)

1. 서 론

피부 노화는 복잡한 생물학적 과정을 거쳐 일어나는 현상으로 지금까지 보고된 피부 노화의 과정은 자외선 (ultraviolet radiation, UV)에 의해 일어나는 광노화와 내인성 요인에 의한 노화로 구분되고 있다. 피부 노화 과정을 지연시키고 방지하려는 목적으로 많은 항 노화 화장품이 개발되고 있으며 특히 주름형성 완화와 개선을 위한 연구가 진행되고 있다. 지금까지 국내에서 주름 개선물질로 고시된 물질은 레티놀(retinol)과 아데노신(adenosine) 등이 있으며 식품의약품안전청에서 고시한 이들 원료는 주름개선 화장품의 원료로 사용되고, 주름 개선 효과를 보이고 있는 것으로 알려져 있다[1]. 많은 연구에 따르면 이들 물질은 주로 콜라겐(collagen) 형성을 증가시키고 콜라겐 분해를 촉진하는 효소인 콜라게나제(collagenase)를 억제시켜 주름형성을 억제하는 것으로 보고되어 있다[2].

최근 연구에서 주름형성에 있어서 콜라겐 이외에 탄력섬유인 엘라스틴(elastin)과 엘라스틴 분해에 관여하는 효소인 엘라스타제(elastase)에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있는 것으로 보고되고 있다[3-5]. 특히, 만성적인 UV 조사에 의해 사람의 피부 표피의 각질형성세포(keratinocytes)에서도 엘라스틴의 전구체인 tropoelastin mRNA 발현이 증가한다는 보고가 있었으며[6], 선택적인 엘라스타제 활성의 억제를 통한 주름형성에서 엘라스타제의 역할이 보고되기도 하였다[7]. 특히 Costello 증후군(Costello syndrome) 같은 유전질환을 앓고 있는 어린이에서 손상된 초기의 탄력섬유 축적으로 인해 주름과 깊은 진피 주름(dermal creases)이 발생한다고 한다. 그러나, 조직학적 분석에 의하면 정상인에게 피부의 주름은 오랜 태양광선의 노출로 진피의 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 구성성분의 손상된 재구성(impaired remodeling)과 단백질 분해(protein degradation)가 원인이 되어 탄력섬유가 사라지고 변형되기 때문이라는 설명이다. 또한 최근 들어 용혈성질환이 있는 경우 탄력섬유에 철이 부족한 특징이 있는데 3가 철(ferric ion)의 세포 내 유무에 따라 엘라스틴 mRNA level과 엘라스틴 생성이 조절된다는 보고도 있다[8]. 또한 자외선을 통한 주름 생성 기전에는 활성산소와 이와 관련된 효소의 변화도 연관되어 있는 것으로 생각되고 있으나, 자외선 이외의 외인성 조절인자와 엘라스틴과 엘라스타제의 변화 상관관계에 대한 보고는 아직 미흡하다.

탄닌산(tannic acid)은 다양한 연구 분야에서 많은 연구가 진행되어 있으며, 탄닌산의 보고된 기능으로는 항암효과[9], 항산화효과[10], DNA 손상억제[11], 쥐의 피부에서 자외선 B에 따른 세포독성억제 및 heat shock protein 70 (HSP70) 생성 억제 효과 등이 보고되어 있다[12].

따라서 본 연구에서는 각종 과일과 견과류의 주요 성분이며, 항산화 효과가 있는 폴리페놀(polyphenol)로 알려진 탄닌산을 이용하여 사람의 섬유아세포(CCD-25Sk human fibroblasts)에서 엘라스타제 활성 억제와 엘라스틴 발현에 대한 탄닌산의 영향을 확인 하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1. 시 약

탄닌산은 시그마(USA)에서 구입하였고, 엘라스타제의 억제제인 phosphoramidon은 Boehringer Mannheim (Germany)에서, 엘라스타제의 합성 기질인 *N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide (STANA)는 Peptide Institute Inc. (Japan)에서 구입하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 바이오니아(Korea), Western blot에 사용한 항체는 Elastin products Company Inc. (USA)에서 구입하였다.

2.2. 세포 배양

사람의 섬유아세포(CCD-25Sk human fibroblasts)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA)에서 구입하였으며, 이 섬유아세포를 37 °C, 5 %의 CO₂, 10 %의 태아소혈청(FBS), 50 µg/mL의 스트렙토마이신 및 50 U/mL의 페니실린을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Korea)에서 배양하였다.

2.3. 세포 생존률의 측정(Crystal Violet Assay)

24-Well plate에 섬유아세포 4.0 × 10⁴ cells를 분주한 후, 5 %의 CO₂, 37 °C 하에서 24 h 동안 배양하여 세포가 배양용기 바닥에 부착할 수 있도록 한다. 다음날 태아소혈청을 제거한 배지로 교환한 다음 다시 24 h 동안 배양한 후, 독성 시험할 탄닌산을 농도별로 처리하고 다시 24 h 동안 배양하여 crystal violet assay로 세포독성을 측정하였다.

먼저 well의 배지를 제거한 후, 각각의 well마다 500

μL의 0.1 % crystal violet을 넣고 5 min 동안 염색한 후, crystal violet 용액을 제거하고, 3차 증류수로 well이 맑아질 때까지 4회 세척한다. 씻어내는 증류수가 맑아지면 증류수를 제거하고, 95 % EtOH을 1 mL 첨가하여 20 min 동안 교반하면서 세포에 염색된 crystal violet을 녹여낸다. 이 용액을 96-well plate에 200 μL씩 분주하고 ELISA reader를 사용하여 590 nm에서 흡광도를 측정한다. 탄닌산을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하여 상대적인 세포독성을 계산하였다.

2.4. 엘라스타제의 활성도 측정

엘라스타제 활성의 측정을 위하여 엘라스타제는 섬유아세포 균질액에 다양한 농도(0.1 ~ 20 μM)로 탄닌산을 처리하여 실험하였다. 또한 섬유아세포에 탄닌산을 직접 동일농도로 처리하고, 48 h 동안 배양한 후, 섬유아세포 균질액에서 엘라스타제 활성의 변화의 차이가 있는지 확인하였다.

섬유아세포 균질액은 배양된 섬유아세포에 0.1 % Triton X-100이 함유된 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0)을 첨가한 후 초음파 분쇄기를 통하여 녹인 다음 3,000 rpm에서 20 min 동안 원심 분리하여 엘라스타제가 들어 있는 상층액을 취한 후, 이를 정량하여 총 단백질 양으로 효소의 활성을 측정하였다.

효소 활성의 측정을 위하여 먼저 섬유아세포에서 균질된 엘라스타제를 분주하여 최종 농도 200 μg/mL가 될 수 있도록 stock solution을 만들고 이를 96-well plate의 각각의 well에 50 μL씩 넣은 후, 46 μL의 0.2 M Tris-HCl 완충액을 넣어 반응 조건을 만든 다음, 탄닌산을 다양한 농도로 1 μL씩 각 well에 넣어 효소 활성 반응을 준비한다. 여기에 엘라스타제의 특이적인 기질인 STANA (50 mM)를 각 well 마다 3 μL씩 넣어준다. 37 °C에서 배양하면서 매 30 min마다 405 nm에서 흡광도를 측정하여 시험할 물질을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하여 상대적인 엘라스타제 활성도를 계산하였다. 양성대조군으로 섬유아세포 생성 엘라스타제의 특이적 억제제인 phosphoramidon을 사용하였다.

2.5. 트로포엘라스틴의 발현 측정

2.5.1. RNA 분리

RNA 분석을 위해 세포 내의 total RNA를 섬유아세포 배양으로부터 RNeasy mini kit (Valencia, USA)을 사용하여 추출하였다. RNA의 순도와 무결성은 A₂₆₀ nm

/ A₂₈₀ nm 비율 측정을 통해 확인하였고, RNA 수득율은 260 nm에서 흡광도로 측정하였고, 사용 전까지 -70 °C에서 보관하였다.

2.5.2. Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

섬유아세포로부터 추출된 total RNA는 1 μg으로 정량하여 AccuPower™ RT/PCR Premix (Bioneer, Korea)의 방법을 통해 역전사시켰다. cDNA는 아래 기술된 primer를 이용하여 증폭시켰다:

Tropoelastin (288 bp product)

forward : 5'-AAAGCAGCAGCAAAGTTCGG-3',

reverse : 5'-ACCTGGGACAACCTGGAATCC-3' [13]

GAPDH (546 bp product)

sense : 5'-ATTGTTGCCATCAATGACCC-3',

antisense : 5'-AGTAGAGGCAGGGATGATGT-3'

[13]

PCR 산물은 1.5 % agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 자외선 아래에서 관찰하였다.

2.5.3. Western Blot 분석

단백질은 cell lysis buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 5 % β-mercaptoethanol, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, protease inhibitors (Mannheim, Germany), 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 10 mM EDTA]로 분리하였다. Lane별로 20 μg의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였고, 0.1 % Tween 20이 포함된 TBS (Tris-buffered saline)에 5 % skim milk를 녹여 primary antibody가 잘 반응하도록 PVDF membrane으로 blot을 만들었다. Primary antibody는 1 : 500 에서 1 : 1000으로 희석하였고, horseradish conjugated secondary antibody를 사용하여 super-signal west pico chemiluminescent kit (Thermo scientific, USA)으로 발색하였다. 결과는 luminescent image analyzer LAS-1000 (Fujifilm, Canada)으로 분석하였다.

2.6. Data 통계처리

실험은 3회 이상 반복하여 평균값과 표준오차를 구하고 Student's *t*-test에 의하여 *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성 있는 것으로 간주하였다.

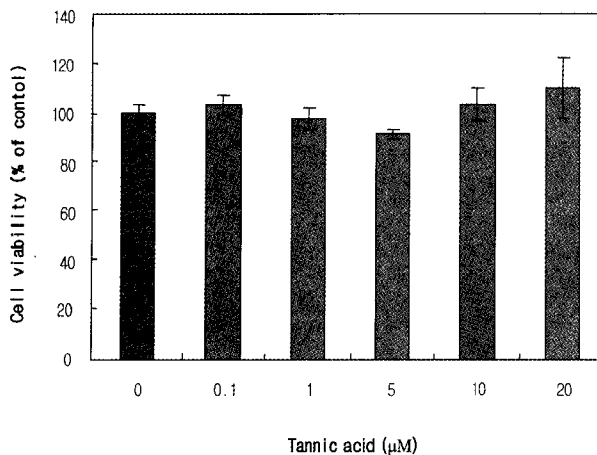


Figure 1. Cell viability after treating with tannic acid. After serum starvation, CCD-25Sk human fibroblasts were incubated for 24 h in serum free media with various concentrations (0.1 ~ 20 μM) of tannic acid. Cell viability was measured by the crystal violet assay, as described in "Materials and Methods". Each determination was made in triplicate and the data represent means ± S.D.

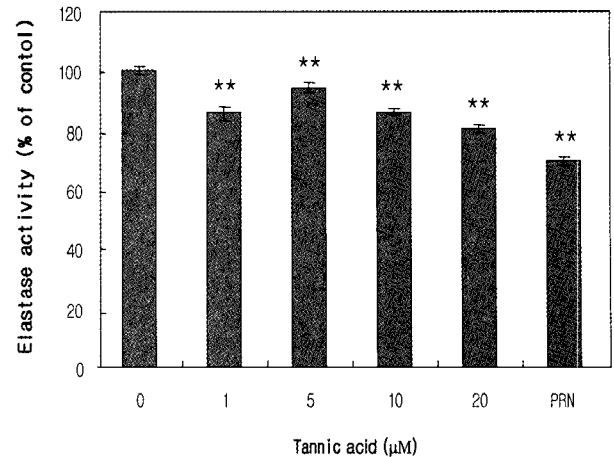


Figure 3. Inhibition of CCD-25Sk human fibroblasts elastase activity by tannic acid. CCD-25Sk human fibroblasts were treated with tannic acid at various concentrations (1 ~ 20 μM) for 48 h. Elastase activity in cell extracts was measured using STANA as substrate. The values are means ± S.D. of triplicate wells. PRN, phosphoramidon. ** $p < 0.01$ compared to control.

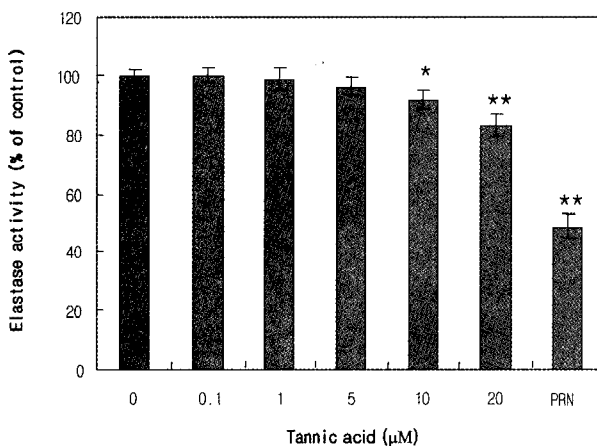


Figure 2. Measurement of elastase activity. Elastase activity was measured using the synthetic substrate STANA. Crude elastase enzyme solution was obtained from CCD-25Sk human fibroblasts lysate. Tannic acid was added into enzyme solution at various concentrations (0.1 ~ 20 μM). PRN, phosphoramidon. Data represent the means ± S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control.

3. 결 과

3.1. 탄닌산이 세포생존율에 미치는 영향

탄닌산이 다량의 폴리페놀을 함유하고 있고 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있지만, 직접적인 사람의 섬

유아세포주에 처리시 세포 생존에 탄닌산이 어떠한 작용을 하는지 알 수 없었기 때문에 우선 다양한 농도의 탄닌산을 처리하여 세포독성이 있는지 확인하고 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 탄닌산은 0.1 ~ 20 μM의 농도 범위에서 세포 독성을 나타내지 않아 이후의 실험에서 적용되었다(Figure 1).

3.2. 탄닌산이 엘라스틴 분해 효소인 엘라스타제 활성에 미치는 영향

탄닌산이 엘라스타제의 활성에 미치는 직접적인 영향이 있는지를 확인하기 위하여 섬유아세포를 lysis buffer로 용해시킨 후, 추출한 엘라스타제에 농도별로 탄닌산을 처리하여 보았다. 그 결과, 10 μM 이상의 농도에서 탄닌산이 대조군과 비교해 유의적으로 엘라스타제의 활성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 탄닌산은 효소에 직접적으로 작용하여 효소의 작용을 억제시키는 것으로 판단되었다. 엘라스타제 활성 억제의 효과를 비교하기 위하여 엘라스타제의 특이적인 억제제로 알려진 phosphoramidon을 양성대조군으로 이용하여 측정하였다(Figure 2).

탄닌산이 엘라스타제를 직접 억제한다는 사실로부터 세포상에서는 엘라스타제의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 위 실험에서와 같은 농도로 탄닌산을 세포에 처리하고 48 h 동안 배양한 후, 엘라스타제의 활성에 미치는 영향을 비교해 보았다. 그 결과 1 μM

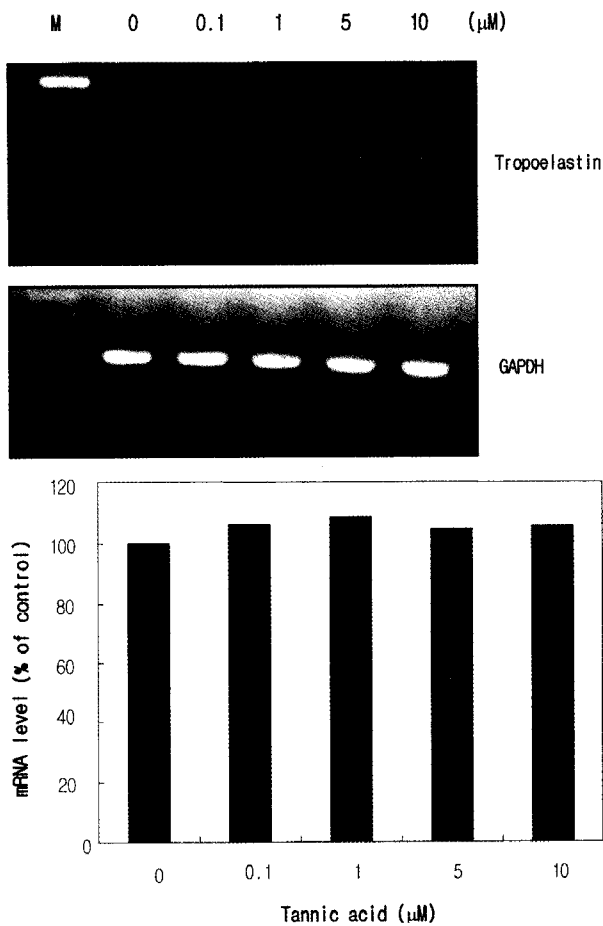


Figure 4. RT-PCR analysis of tropoelastin mRNA level. CCD-25Sk human fibroblasts were treated with 0.1 ~ 10 mM tannic acid for 48 h. Total RNA was isolated from the cells and used for cDNA preparation. Equal amounts of cDNA were amplified with primers specific for tropoelastin and GAPDH primers were used as a control to ensure the even loading. The results of PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Tropoelastin mRNA level was determined by densitometric analysis and is shown below the photograph (M: marker).

에서 20 μM까지의 농도에서 모두 탄닌산에 의해 엘라스타제의 활성이 대조군과 비교해 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3). 특히 탄닌산 20 μM에서는 양성 대조군으로 사용한 phosphoramidon과 비슷한 정도로 엘라스타제의 활성을 억제하였다.

3.3. 엘라스틴 전구체인 트로포엘라스틴 발현에 미치는 탄닌산의 효과

탄닌산이 엘라스타제의 활성을 직접적으로 억제하고, 이러한 효과가 세포상에서도 유효한 것으로 확인됨에 따

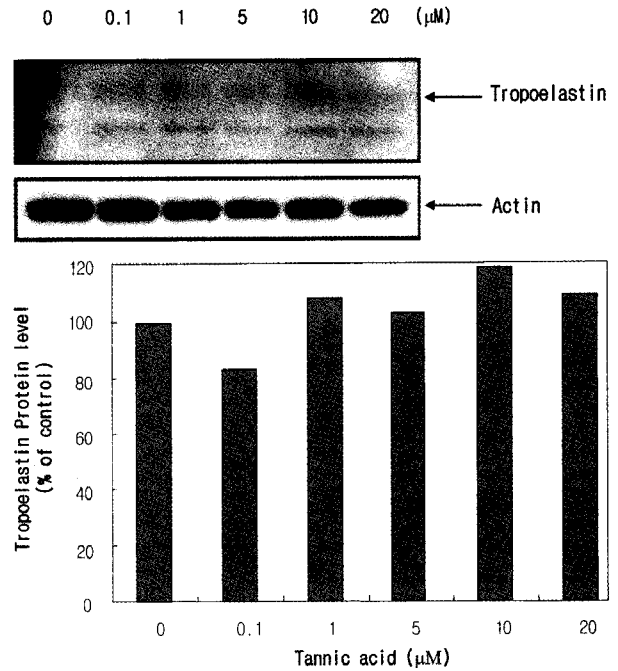


Figure 5. Western blot analysis using human tropoelastin antibody. CCD-25Sk human fibroblasts were treated with 0.1 ~ 20 μM tannic acid for 48 h. Whole cell lysates were then subjected to Western blot analysis using the antibody against human tropoelastin. Equivalent amount of protein loadings were identified using anti-actin antibody. Tropoelastin protein level was determined by densitometric analysis and is shown below the photograph.

라 이번에는 주름형성에 관련이 있는 엘라스틴의 발현과 생성에도 작용을 하는지 알아보기 위해 우선, 엘라스틴의 전구체로 알려진 트로포엘라스틴의 mRNA의 수준의 변화를 관찰하였다. 그 결과 탄닌산은 트로포엘라스틴의 mRNA 발현에는 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 RT-PCR을 통해 확인할 수 있었다(Figure 4).

3.4. 트로포엘라스틴 단백질의 발현에 미치는 탄닌산의 영향

탄닌산이 트로포엘라스틴 mRNA 발현을 약하게 증가시키는 결과에 따라, Western blot을 통해 트로포엘라스틴 단백질의 발현을 확인한 결과, 탄닌산의 처리에 따라 트로포엘라스틴 단백질 발현에도 아무런 영향을 주지 않았다(Figure 5).

4. 결 론

사람의 피부 탄력성 저하와 주름 형성에는 콜라겐의

감소뿐만 아니라 피부탄력 섬유의 구성성분인 엘라스틴 저하도 관여하는 것으로 보고되었다[3]. 엘라스틴은 피부 ECM을 구성하는 성분중의 하나로 최근 보고에 의하면 장기적이고 반복적인 UV 노출로 발생하는 노화 과정과 주름 형성에 엘라스틴을 분해하는 엘라스타제의 작용이 관여한다고 했다[7]. 피부에 존재하는 엘라스타제의 종류로는 serine protease 계통의 호중구(neutrophil) 엘라스타제와 metalloproteinase 계통의 fibroblast 엘라스타제가 보고되어 있다[14,15]. 이들 엘라스타제들은 노화과정뿐만 아니라, 염증반응을 일으키는 각종 피부질환에도 작용하는 것으로 알려져 있으며 탄력섬유를 퇴화시킨다고 보고되었다[16]. 흥미로운 점은 호중구 엘라스타제의 경우 염증반응에서 혈액의 호중구가 피부로 침투하면서 엘라스틴에 영향을 미치지, 홍반을 발생시키지 않는 정도의 UV를 조사한 생쥐의 피부조직에서 호중구의 침투와는 관련 없이 주름이 발생하는 것이 관찰되었다[17]. 이와 같은 사실은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 엘라스타제가 피부주름 형성에 영향을 준다는 것을 시사하고 있다.

일반적으로 쥐의 피부를 이용하여 UV조사 후 엘라스타제의 활성을 측정하고 선택적인 억제제를 통하여 효소 활성을 억제함으로써 피부주름을 방지하는 실험은 많이 진행되어 왔다[18]. 선택적인 억제제의 사용은 합성자체가 용이 하지 않을 뿐만 아니라, 임상적으로 직접사용하기 까지는 많은 연구 과정을 거쳐야 하고 안정성 확인도 필요하다는 단점을 가지고 있다. 따라서, 본 연구에서는 일반적으로 항산화 기능이 있으며, 피부세포 독성 억제 효과가 있고, 많은 견과류나 과일에서 발견되는 폴리페놀인 탄닌산을 이용하여 사람의 피부 섬유아세포주의 엘라스타제 활성 억제 효과를 확인하였다. 탄닌산은 불용해성의 소와 돼지의 엘라스틴에 부착되어 특히, 돼지의 췌장 엘라스타제에 의한 엘라스틴의 변성을 억제한다고 알려져 있다[4]. 본 실험 결과, 사람 엘라스타제의 활성을 탄닌산이 직접적으로 억제하는 것을 발견할 수 있었으며, 특히 탄닌산 처리 후, 농도 의존적으로 엘라스타제 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 더 나아가, 탄닌산이 엘라스틴 생성 전구체인 트로포엘라스틴의 발현에 영향을 주어 직접적인 엘라스틴 발현 증가나 변성 방지에 효과가 있는지 확인하기 위하여 RT-PCR과 Western blot을 이용하여 mRNA와 단백질 발현양상을 확인하였다. 그러나 탄닌산이 사람의 섬유아세포주에서 mRNA와 단백질 수준에서 엘라스틴의 합성을 촉진하거나 증가시키는 작용을 한다는 뚜렷한 증거는 찾을 수 없었다. 다만, 사람의 피부조직을 생검(skin biopsy)하여 10

일 동안 탄닌산을 처리한 배지에서 elastogenic effect가 강화된다[19]는 보고를 참고해 보면 섬유아세포에서 탄닌산의 역할은 직접적으로 엘라스타제의 활성을 억제하여 탄력섬유의 성분인 엘라스틴의 3차원적 구조가 변성되는 것을 방지하여 궁극적으로 엘라스틴을 보호하는 역할을 하는 것으로 보인다. 그리고 본 실험에서 이러한 과정은 UV조사 없이 직접적인 탄닌산의 처리에서도 효과가 있는 것으로 확인이 되었다. 이러한 결과는 탄닌산이 UV와 같은 외부 환경적인 자극에 의한 주름 형성 방지뿐만 아니라, 각종 내인성 요인에 의한 피부탄력 섬유의 퇴화나 엘라스틴 변성에 효과적으로 이용할 수 있는 물질이라는 것을 제시한다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

참고 문헌

1. E. S. Chan, P. Fernandez, A. A. Merchant, M. C. Montesinos, S. Trzaska, A. Desai, C. F. Tung, D. N. Khoa, M. H. Pillinger, A. B. Reiss, M. Tomic-Canic, J. F. Chen, M. A. Schwarzschild, and B. N. Cronstein, Adenosine A2A receptors in diffuse dermal fibrosis: pathogenic role in human dermal fibroblasts and in a murine model of scleroderma, *Arthritis Rheum*, **54**, 2632 (2006).
2. I. Ghersetich, P. Teofoli, M. Benci, and T. Lotti, Ultrastructural study of hyaluronic acid before and after the use of a pulsed electromagnetic field, electrolysis, in the treatment of wrinkles, *Int. J. Dermatol.*, **33**, 661 (1994).
3. F. Antonicelli, G. Bellon, L. Debelle, and W. Hornebeck, Elastin-elastases and inflamm-aging, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **79**, 99 (2007).
4. J. C. Isenburg, D. T. Simionescu, and N. R. Vyavahare, Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid, *Biomaterials*, **25**, 3293 (2004).
5. S. Seite, H. Zucchi, D. Septier, S. Igondjo-Tchen, K. Senni, and G. Godeau, Elastin changes during chro-

- nological and photo-ageing: the important role of lysozyme, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **20**, 980 (2006).
6. J. Y. Seo, S. H. Lee, C. S. Youn, H. R. Choi, G. E. Rhie, K. H. Cho, K. H. Kim, K. C. Park, H. C. Eun, and J. H. Chung, Ultraviolet radiation increases tropoelastin mRNA expression in the epidermis of human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **116**, 915 (2001).
 7. N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa, The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity, *Photochem. Photobiol.*, **74**, 283 (2001).
 8. S. Bunda, N. Kaviani, and A. Hinek, Fluctuations of intracellular iron modulate elastin production, *J. Biol. Chem.*, **280**, 2341 (2005).
 9. M. Hirose, T. Hoshiya, K. Akagi, M. Futakuchi, and N. Ito, Inhibition of mammary gland carcinogenesis by green tea catechins and other naturally occurring antioxidants in female Sprague-Dawley rats pretreated with 7,12-dimethylbenz[α] anthracene, *Cancer Lett.*, **83**, 149 (1994).
 10. L. Ramanathan and N. P. Das, Inhibitory effects of some natural products on metal-induced lipid oxidation in cooked fish, *Biol. Trace Elem. Res.*, **34**, 35 (1992).
 11. N. Fu, Protective effect of tannic acid against TPA- and cigarette smoke condensate-induced DNA strand breaks in human white cells and its antioxidant action, *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, **13**, 347 (1991).
 12. S. Y. Lee, D. D. Jang, R. M. Ahn, and H. S. Ann, Effects of tannic acid on the skin toxicity and heat shock protein induction by UVB irradiation in hairless mouse, *Kor. J. Toxicol.*, **13**, 79 (1997).
 13. E. D. Son, J. Y. Lee, S. Lee, M. S. Kim, B. G. Lee, I. S. Chang, and J. H. Chung, Topical application of 17 β -estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating TGF- β signaling in aged human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 1149 (2005).
 14. G. Godeau and W. Hornebeck, Morphometric analysis of the degradation of human skin elastic fibres by human leukocyte elastase (EC 3-4-21-37) and human skin fibroblast elastase (EC 3-4-24), *Pathol. Biol. (Paris)*, **36**, 1133 (1988).
 15. R. Hornsy, P. Pelletier-Lebon, J. M. Tixier, G. Godeau, L. Robert, and W. Hornebeck, Characterization of human skin fibroblasts elastase activity, *J. Invest. Dermatol.*, **91**, 472 (1988).
 16. Z. Werb, M. J. Randa, J. H. Mckenrow, and R. A. Sandhaus, Elastase and elastin degradation, *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 154 (1982).
 17. D. B. Learn and S. J. Moloney, Numbers of murine dermal mast cells remain unchanged during chronic ultraviolet B irradiation, *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, **8**, 195 (1991).
 18. K. Tsukahara, Y. Takema, S. Moriwaki, N. Tsuji, Y. Suzuki, T. Fujimura, and G. Imokawa, Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation, *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 671 (2001).
 19. F. Jimenez, T. F. Mitts, K. Liu, Y. Wang, and A. Hinek, Ellagic and tannic acids protect newly synthesized elastic fibers from premature enzymatic degradation in dermal fibroblast cultures, *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1272 (2006).