

피부 섬유아세포에서 광나무 추출물의 항 노화 효과

김 윤 정 · 이 유 리 · 천 종 우 · 이 현 상[†]

(주)에이씨티 기술연구소

(2010년 12월 3일 접수, 2010년 12월 15일 수정, 2010년 12월 17일 채택)

Anti-Aging Effect of *Ligustrum japonicum* Extract in the Human Fibroblast Cells

Yun Jeong Kim, Yu Ri Lee, Jong Woo Cheon, and Hyun Sang Lee[†]

ACT Co., Ltd. R&D Center, 102-201, Digital Empire II, 486, Sin-dong, Youngtong-gu, Suwon-si,
Gyeonggi-do 443-734, Korea

(Received December 3, 2010; Revised December 15, 2010; Accepted December 17, 2010)

요약: 본 연구에서는 천연 추출물을 이용하여 화장품 원료를 개발하고자 다양한 천연물을 대상으로 조사하였고 그중 광나무 추출물을 선별하여 주름 개선 원료로 사용하고자 하였다. 고성능액체크로마토그래피를 수행하여 주름 개선 효과로 잘 알려진 oleanolic acid 31.06 %와 ursolic acid 8.92 %를 확인하였다. 제조된 광나무 추출물은 피부 섬유아세포에서 procollagen type I 과 hyaluronan synthase-3의 발현을 증가시키고 matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, cyclooxygenase-2의 발현을 감소시킬 뿐 아니라 elastase의 활성을 억제하여 주름 개선 기능을 갖는 것을 확인하였다. 따라서 광나무 추출물은 주름개선 화장품 소재로 개발될 수 있는 잠재력이 있다.

Abstract: To develop wrinkle care cosmetic ingredients, various species of plant extracts were investigated. Accordingly, *Ligustrum japonicum* was selected as a candidate for developing cosmetic ingredient. By high performance liquid chromatography, 31.06 % of oleanolic acid and 8.92 % of ursolic acid which are well-known for anti-wrinkle effect were analyzed. The possibility of *Ligustrum japonicum* fruits extract (LJE) as a cosmetic ingredient was investigated using several biomarkers related to anti-aging, including anti-wrinkle, moisturizing and anti-inflammation. Procollagen type I and hyaluronan synthase-3 gene expression were increased by LJE in a concentration-dependent manner, whereas elastase activity and matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2 and cyclooxygenase-2 gene expression were inhibited. As the results LJE is applicable for a potential cosmetic ingredient focused on anti-aging effect.

Keywords: *Ligustrum japonicum*, procollagen type I, hyaluronan synthase-3, matrix metalloproteinases, cyclooxygenase-2

1. 서 론

노화란 나이가 많아짐에 따라 신체적, 정신적 기능이 쇠퇴하는 것으로 노령화에 따라 나타나는 생체의 퇴화적 변화이다. 주름살 증가, 탄력성 감소, 피부 처짐 등의 현상이 동반되는 피부노화는 내인성 인자에 의한 자연노화와 장기간에 걸친 광 노출로 피부 변화의 현상이 오는

광 노화를 들 수 있다[1,2]. 따라서 이러한 피부노화를 억제하고 지연시키고자 주름개선 및 억제용 화장품의 개발이 증가하고 있으며 이러한 화장품은 젊음을 유지하고자 하는 사람들의 많은 관심을 받고 있다.

주름살은 특정 방향으로 근육이 오랜 기간 동안 반복하여 움직임으로써 형성되는데 연령, 외부환경, 자외선 조사 등에 영향을 받는다. 이러한 인자에 의한 피부 세포의 손상은 여러 가지 노화 현상을 일으키는데 진피 매트릭스를 구성하는 콜라겐, 엘라스틴의 생성 및 분해가 원

[†] 주 저자 (e-mail: yjk@actcos.com)

활하지 못해 매트릭스의 견고성이 떨어져 피부의 탄력이 떨어지고 주름이 생성된다[3]. 특히 자외선에 의한 피부 손상은 피부에 주름 뿐 아니라 피부 염증, DNA 손상, 색소 침착 등을 유발하여 심한 경우에는 피부암을 일으키는 원인이 되기도 하며 특히 피부암과 관련하여 cyclooxygenase (COX)의 연구가 활발히 진행되고 있다[4,5].

광 노화의 기전은 자외선 조사에 의해 콜라겐의 합성이 감소하는 동시에 기질 금속단백 분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)의 발현이 증가하여 기질의 주요 구성 성분인 콜라겐과 엘라스틴 등의 분해가 증가되어 주름살을 비롯한 광 노화 현상이 진행되는 것으로 알려져 있다[6,7]. MMPs는 10개 이상의 아연 의존성 내부 단백질분해효소(zinc-dependent endoproteinase)로 구성되어 있으며 특히 MMP-2는 MMP-1, 13, 18에 의해 분해된 교원질 조각을 또 다시 분해하는 것으로 알려져 있어 광 노화 현상에 크게 관여한다[8]. Elastase 역시 탄력섬유의 분해과정에서 탄력소를 분해하는 효소로 자외선 조사에 의해 그 활성이 증가하여 광 노화 현상에 관여하게 된다.

Hyaluronan (HA)는 피부의 세포외기질 구성성분으로 수분을 보유하고 있는 것으로 알려져 있으며 인체 피부에서 HA의 양은 노화와 함께 감소되는 것으로 보고된 바 있다[9,10]. HA는 hyaluronan synthase (HAS)에 의해 합성되므로 피부 내에서 HAS의 발현이 노화 현상과 관련있음을 알 수 있다.

광나무(*Ligustrum japonicum*)는 몰푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 상록관목으로 일본, 대만 및 우리나라 제주도, 남부 지방의 산야지 해발 150 ~ 1,100 m 지역 해변산록 저지대에 자생하며, 높이 3 ~ 5 m이고 가지는 회색이며 피목이 뚜렷하다.

과실에는 oleanic acid, mannitol, glucose, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linolenic acid이 함유되어 있고 과피에는 oleanolic acid, acetyl oleanolic acid, ursolic acid가 함유되었고 종자에는 지방유 14.9 %가 함유되었다. 지방유 중에는 palmitic acid과 stearic acid가 19.5 % oleic acid, linoleic acid 등이 80.5 % 함유되어 있으며, 항암 작용, 항균 작용, 노화방지 작용이 있다고 보고되어 있다[11].

이에 본 연구는 주름개선에 효능이 있는 광나무 추출물을 이용하여 콜라겐의 발현과 elastase의 활성 저해를 확인하여 주름 개선 화장품의 원료로 사용 가능한지 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 광나무 추출물의 제조 및 분석

2.1.1. 광나무 추출물의 제조

제주도에서 유래한 광나무를 음지에서 건조하여 분쇄한 뒤, 1 kg을 10배 가량의 70 % (V/V) 에탄올 수용액으로 6 h 가운 환류 추출하고 냉침한 후, 8 μ m 투과사이즈를 갖는 여과지로 여과하였다. 이 여과된 추출액을 60 $^{\circ}$ C 이하에서 감압 농축한 후 감압건조기를 이용해 완전히 건조시켜 광나무 추출물 29 g을 수득하였다.

2.1.2. HPLC를 이용한 광나무 추출물의 분석

광나무 추출물의 유효성분을 분석하기 위해 고성능액체크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC) 분석을 수행하였다. 분석 조건으로 크로마토그래피는 ProStar210/PrepStar218series를, 컬럼은 RP - C18 (250 nm \times 4.6 nm, 5 μ m, Mightysil), 측정 파장은 203 nm로 하였다. 이동상은 Acetonitrile에 0.1 % Phosphoric acid (H₃PO₄)를 9 : 1로 희석하여 사용하였다.

2.2. 세포배양

사람의 정상 섬유아세포(CCD-986Sk, human skin fibroblast)는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였으며, 이 섬유아세포를 37 $^{\circ}$ C, 5 %의 CO₂ 하에서 10 %의 태아소혈청(FBS, Lonza), 50 units/mL의 streptomycin (Sigma, USA)을 첨가한 ISCOVES MODIFIED DULBECCOS-M (IMDM, Invitrogen)에서 배양하였다.

2.3. 세포 생존율의 측정(MTT Assay)

세포를 96-well plate의 각 well에 1 \times 10⁵ cells/well의 농도로 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 하에서 24 h 동안 배양하여 세포를 부착시켰다. 다음날 세포의 배양 배지를 제거하고 광나무 추출물을 농도별로 처리하여 다시 24 h 동안 배양한 후 배지를 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline)로 세포를 두 번씩 세척해주었다. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium boromide, Sigma, USA)를 3 mg/mL 농도가 되도록 PBS에 녹이고 이를 다시 새 배지를 이용하여 1/10로 희석한 후 각 well에 100 μ L 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5 %의 CO₂ 하에서 4 h 동안 배양하였다. 각 well에 들어있는 여분의 배지를 제거하여 DMSO (Dimethyl sulfoxide)를 한 well 당 150

Table 1. Primer Pair

Gene		Primer sequence	
GAPDH	Forward	5' - AAC GAA TTT GGT CGA ACA GC - 3'	
	Reverse	5' - TGA GGA GGG ATT CAG TG - 3'	
COL1A1	Forward	5' - AGC CAG CAG ATC GAG AAC AT - 3'	
	Reverse	5' - TCT TGT CCT TGG GGT TCT TG - 3'	
MMP-1	Forward	5' - GAT GTG GAG TGC CTG ATG TG - 3'	
	Reverse	5' - TGC TTG ACC CTC AGA GAC CT - 3'	
MMP-2	Forward	5' - ACA AAG AGT GGC AGT GCA AT - 3'	
	Reverse	5' - GTG CTC GTT TCC GTA GTA GG - 3'	
HAS-3	Forward	5' - GAG GAC TGG TAC CAT CAG AA - 3'	
	Reverse	5' - GAG GAC TGG TAC CAT CAG AA - 3'	
COX-2	Forward	5' - TTC AAA TGA GAT TGT GGA AAA ATT GCT - 3'	
	Reverse	5' - AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT - 3'	

μL 넣고 30 min 동안 교반 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

2.4. Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)을 이용한 mRNA 발현 측정

2.4.1. RNA 분리

RNA 분석을 위해 세포 내의 total RNA를 섬유아세포 배양으로부터 Trizol reagent (Invitrogen, USA)를 사용하여 추출하였다. RNA의 순도와 무결성은 A₂₆₀ nm / A₂₈₀ nm비율 측정을 통해 확인하였고 RNA 수득율은 260 nm에서 흡광도로 측정하였다.

2.4.2. RT-PCR

cDNA합성은 3 μg의 total RNA를 Oligo dT 15 (500 ng/μL) primer, dNTP (10 mM), RTase inhibitor (40 units/μL), Powerscript II RTase (Clontech, USA)를 첨가하여 25 °C에서 10 min간 primer annealing, 42 °C에서 60 min간 cDNA를 합성하고 95 °C에서 5 min간 RTase denaturation시켰다. PCR은 cDNA로부터 GAPDH, COL1A1, HAS-3, MMP-1, MMP-2, COX-2를 증폭하기 위하여 cDNA 3 μL, 2.5 mM dNTP 2 μL, 10 pmol primer 각각 2 μL, 10X buffer [10 mM Tris - HCl (pH 8.8), (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgCl₂] 5 μL, 2.5 unit taq polymerase 0.5 μL를 혼합하고 증류수를 더하여 50 μL로 조정하였다. 각 유전자들의 primer 서열은 Table 1과 같다. PCR에 의하여 생성된 산물은 1 % agarose gel에서 전기영동하여 image analyzer (UGEN, U:Genius, UK)

로 확인하였으며, 각 band의 density는 Densitometric program (Gene Tools from Syngene)을 이용하여 측정하였다.

2.5. Zymography 분석

MMP-2의 활성을 전기영동을 통해 측정하는 방법 [12]을 응용하여 단백질은 cell lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF]로 분리한 후 Bradford assay를 실시하여 단백질 양을 확인한 후 사용하였다. 단백질과 Tris - Glycine SDS buffer를 섞은 뒤 상온에서 10 min간 반응시킨 후 0.1 % gelatin이 포함된 SDS-PAGE에서 전기 영동시켰다. 그 후 10× Zymogram Renaturing buffer를 물과 1 : 9로 희석하여 여기에 gel을 담근 후 30 min 동안 상온에서 gently shaking 해준 뒤 1 × Zymogram Developing buffer에 넣어서 상온에서 30 min동안 반응시켰다. 그 후 1 × Zymogram Developing buffer로 교환해준 뒤 37 °C에서 4 h 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 Coomassie blue R-250으로 30 min 간 staining 해주고 gel 상에 밴드가 확인될 때까지 destaining하였다.

2.6. Elastase 활성 측정

Elastase 활성 측정을 위하여 Elastin-Congo red agar diffusion 방법[13]을 사용하였다. 15 mL의 200 mM Tris HCl Buffer (pH 8.8)에 0.1 % Elastin-Congo red와 2.5 % agar를 녹여 균한 뒤 시료를 주입할 수 있는 well (diameter = 5 mm)을 준비하였다. 농도별로 준비한 시료와 elastase (1,000 units/mL, Sigma, USA)를 각각 10 μL 준비하여 microtube에서 섞은 후 상온에서 10 min 간

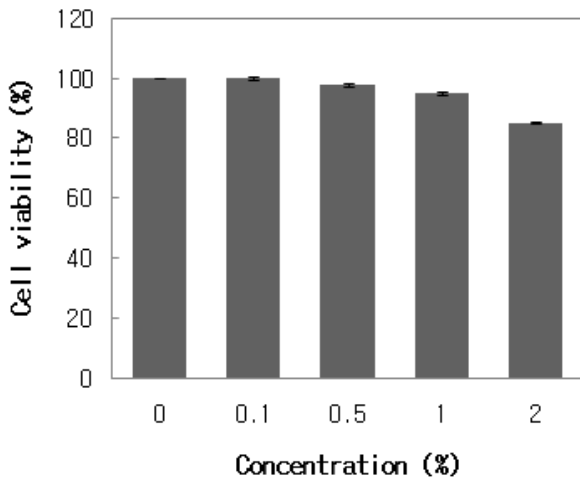


Figure 1. Effect of LJE on cell viability. Cells were treated with various concentration of LJE and cell viability measured by MTT assay. All experiments were done in triplicate.

반응시켰다. 반응 후 상등액을 10 μ L 취하여 Elastin-Congo red agar의 well에 주입하고 agar plate를 37 $^{\circ}$ C에서 24 h 동안 배양 후 halo diameters를 측정하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 elastase만 주입하여 상대적인 elastase 활성을 측정하였고 양성 대조군으로는 0.002 % 레티놀 크리스탈(167 I.U.)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 광나무 추출물의 Oleanolic Acid와 Ursolic Acid 함량 분석

광나무 추출물의 항 노화 효과를 확인하기에 앞서 콜라겐의 분해를 막아 주름을 예방하는 것으로 알려진 oleanolic acid와 ursolic acid의 존재 및 그 함량을 확인하고자 하였다. 광나무 추출물의 oleanolic acid와 ursolic acid의 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과 oleanolic acid 31.06 %, ursolic acid 8.92 %로 확인되어 이러한 성분으로 인하여 광나무 추출물이 항 노화 효과가 있을 것으로 예상하였다(data not shown).

3.2. 세포 생존율에 미치는 영향

광나무 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 광나무 추출물의 사용 농도가 0.1 % 이하일 때 세포 독성이 전혀 없는 것을 확인하였고 2 %를 사용 하였을 시에도 85 % 이상의 높은 세포 생존율을 보여 2 % 이하의 농도 범위 내에서 주름 개선 효과

를 지닌 소재로 사용하였을 시 피부에 안전한 것으로 확인하였다(Figure 1).

3.3. COL1A1, HAS-3, MMP-1, MMP-2, COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

광 노화의 기전에 관여하는 콜라겐의 발현과 세포외기질 구성 성분으로 수분을 보유하고 있는 HA를 합성하는 HAS-3의 발현을 통해 광나무 추출물이 각 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 정상 섬유아세포에 광나무 추출물을 농도별로 처리한 후 RT-PCR을 수행하여 COL1A1과 HAS-3의 발현량을 확인하였다. 콜라겐 분해 효소인 MMP-1, MMP-2와 자외선 노출로 인한 피부암 발생에 관여하는 COX-2의 발현을 확인하고자 정상 섬유아세포에 동일한 농도로 광나무 추출물을 처리한 후 320 nm의 UVB에서 1 h 동안 노출시킨 뒤 RT-PCR을 수행하여 MMP-1, MMP-2, COX-2의 발현량을 확인하였다. 그 결과 광나무 추출물의 처리 농도가 증가할수록 COL1A1과 HAS-3의 발현량이 증가하여 광나무 추출물이 COL1A1과 HAS-3의 발현을 증가시키는 것을 확인하였고 MMP-1, MMP-2, COX-2의 발현량이 광나무 추출물의 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Figure 2). 이러한 결과를 통해 광나무 추출물은 피부에 탄성과 힘을 주는 콜라겐의 발현을 증가시키고 HAS-3의 발현 증가를 통해 피부의 수분 보유 능력을 증가시키므로써 피부의 탄력과 보습력 증가로 인해 피부의 주름 개선 효능이 있음을 확인하였다. 또한 광나무 추출물은 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-1, MMP-2의 발현을 억제하고 광 노화의 주된 요인인 자외선으로 인해 생성되는 COX-2의 발현을 억제함으로써 피부 주름 형성을 억제할 수 있음을 확인하였다.

3.4. MMP-2 단백질의 활성에 미치는 영향

MMP-2는 MMP-1, 13, 18에 의해 분해된 교원질 조각을 또 다시 분해하여 광노화 현상에 크게 관여한다. 따라서, 광나무 추출물에 의한 MMP-2의 mRNA 발현 감소는 UVB에 기인한 피부 손상을 방지할 수 있음을 확인하였으며, 이후 MMP-2의 mRNA 발현 뿐 아니라 단백질 활성에도 관여하는지 확인하기 위하여 zymography를 수행한 결과 UVB에 손상된 세포에 광나무 추출물을 농도별로 처리하였을 시 MMP-2의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이는 MMP-2의 mRNA 발현량이 광나무 추출물에 의해 감소하는 것과 같은 양상을 보여 광나무 추출물은 MMP-2의 발현 뿐 아니라

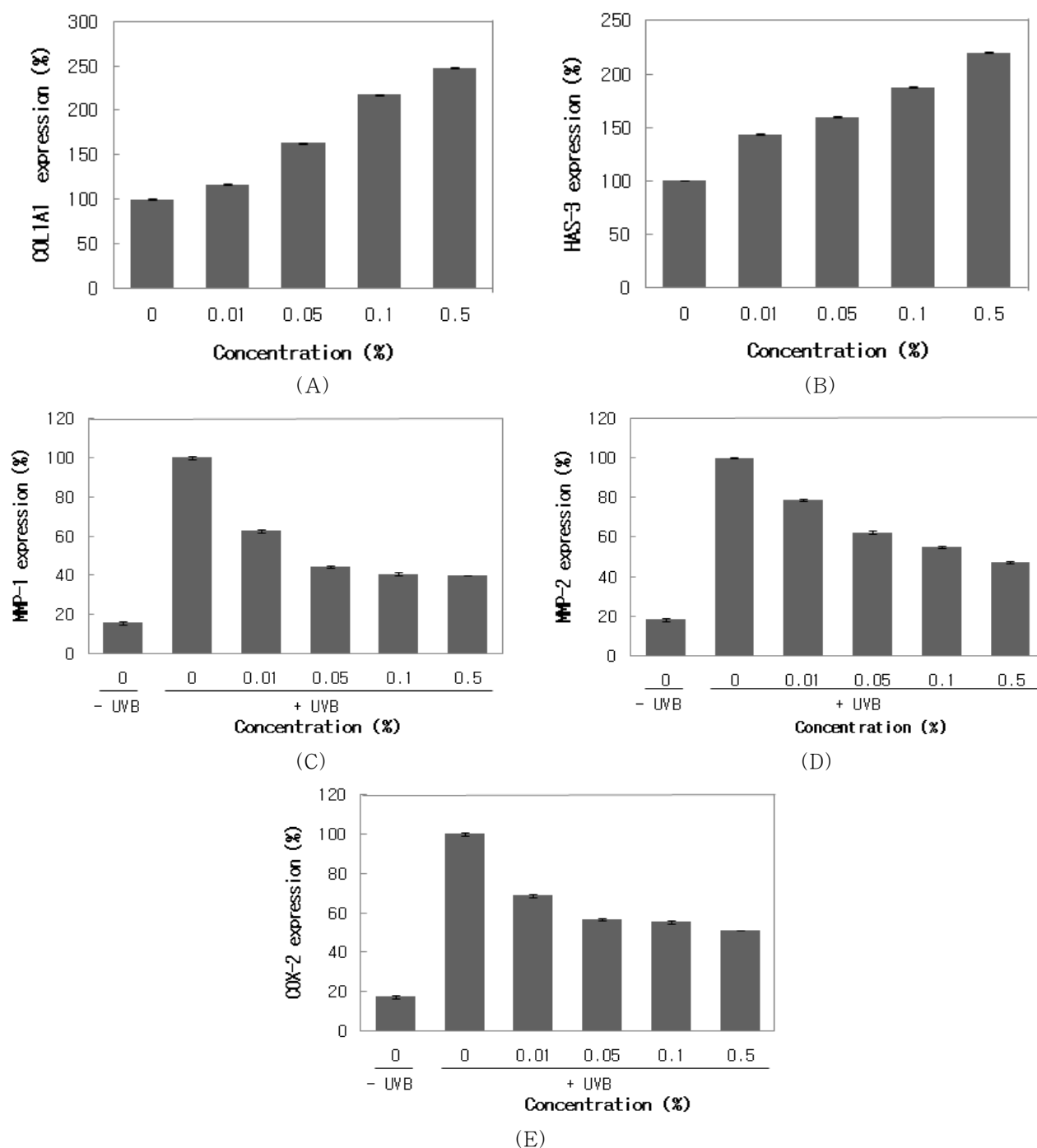


Figure 2. Determination of gene expression by RT-PCR using the gene specific primers (A) COL1A1; (B) HAS-3; (C) MMP-1; (D) MMP-2; (E) COX-2. Cells were treated with various concentration of LJE.

단백질 활성화에도 관여하여 주름 개선 효과를 가짐을 확인하였다(Figure 3).

3.5. Elastase 활성 억제 효과

주름 형성에 있어서 콜라겐 외에 피부에 탄력을 나타내는 구성성분 중 하나인 엘라스틴은 MMPs에 속하는

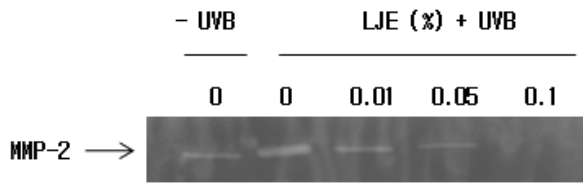


Figure 3. Determination of MMP-2 expression in human skin fibroblasts by gelatin zymography. Cells were treated with various concentration of LJE.

elastase에 의해 분해된다. Elastase의 활성화는 피부의 탄력과 주름 형성에 주요한 원인이 되므로 광나무 추출물에 의한 elastase의 활성을 확인하고자 Elastin - Congo red 법을 통해 배지 상에 나타나는 halo의 직경을 측정하여 광나무 추출물의 elastase 활성을 측정하였다. 그 결과 광나무 추출물의 처리 농도가 증가할수록 elastase 활성이 감소하는 것을 확인하였고 0.1 % 이상의 농도에서는 양성대조군으로 사용한 레티놀 크리스탈(167 I.U.)과 유사한 elastase 활성을 확인하였다(Figure 4).

4. 결 론

본 연구에서는 광나무 추출물의 유효성분을 분석하고 주름 개선과 관련하여 효능을 확인하는데 중점을 두었다. HPLC 분석 결과, 광나무 추출물에는 oleanolic acid 31.06 %와 ursolic acid 8.92 %를 함유하고 있음을 확인하였고 이러한 성분은 자외선에 의해 발생하는 ROS의 생성을 막아주어 콜라겐 분해효소의 생성을 억제시킴으로써 콜라겐의 분해를 막아 주름을 예방하는 것으로 알려져[14,15] 광나무 추출물을 이용하여 사람의 정상 섬유아세포에서 주름 개선 효능을 확인하였다. 그 결과 광나무 추출물은 피부의 주요한 구성 성분인 COL1A1의 발현을 증가시킴으로써 피부에 탄성과 힘을 주고 HAS-3의 발현을 증가시켜 피부의 수분 보유 능력을 증가 시킬 것으로 기대하고 있다. 광노화의 주요 원인인 자외선으로부터 증가되는 MMP-1의 발현과 MMP-2의 발현 및 활성을 감소시켜 주름 생성을 억제하는 효과를 확인하였고 COX-2의 발현을 억제시킴으로써 자외선으로부터 피부를 보호하여 염증유발을 억제하는 효과도 확인할 수 있었다. 또한 광나무 추출물은 피부의 탄력과 관련 있는 엘라스틴의 분해효소인 elastase의 활성을 억제함으로써 주름 개선에 관여하는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통해 광나무 추출물은 주름 개선 소재로 화장품에 적용될 수 있다고 사료된다.

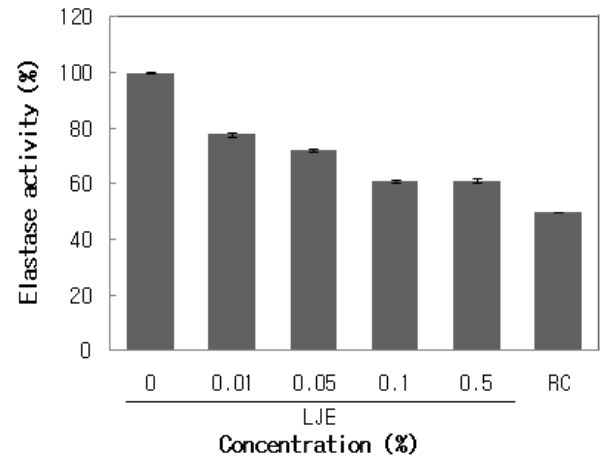


Figure 4. The effect of elastase inhibition assay with elastin-congo red agar diffusion method. LJE concentrations of loading samples were 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 %. RC: 0.002 % Retinol crystal (167 I.U.).

참 고 문 헌

1. J. Parrado, M. Bougria, A. Ayala, A. Castano, and A. Machado, Effects of aging on the various steps of protein synthesis fragmentation of elongation factors 2, *Free Radical Biology & Medicine*, **26**(3-4), 362 (1999).
2. M. Inui, M. Ooe, K. Fujii, H. Matsunaka, M. Yoshida, and M. Ichihashi, Mechanisms of inhibitory effects of CoQ10 on UVB-induced wrinkle formation *in vitro* and *in vivo*, *IOS Press*, **32**, 237 (2008).
3. E. S. Yang, R. H. Hong, and S. M. Kang, The effect of genistein on the proliferation and type I pN collagen synthesis in aged normal human fibroblasts, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **35**(4), 316 (2007).
4. J. Y. Seo, E. K. Kim, S. H. Lee, K. C. Park, K. H. Kim, H. C. Eun, and J. H. Chung, Enhanced expression of cyclooxygenase-2 by UV in aged human skin *in vivo*, *Mechanisms of Ageing and Development*, **124**, 903 (2003).
5. J. A. Nichols and S. K. Katiyar, Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms, *Arch. Dermatol. Res.*, **302**(2), 71 (2009).

6. A. Hashem, K. Y. Jun, E. Y. Lee, S. Y. Lim, H. Y. Park Choo, and Y. J. Kwon, A rapid and sensitive screening system for human type I collagen with the aim of discovering potent anti-aging or anti-fibrotic compounds, *Mol. Cells OS*, **26**(6), 625 (2008).
7. W. M. Yang, H. M. Kim, M. S. Chang, W. S. Park, W. N. Kim, S. W. Kim, D. G. Choi, H. C. Lee, Y. K. Kim, and S. K. Park, Effects of ethanol extract of *Nelumbo nucifera* leaves on anti-oxidation and type I procollagen expression in CCD-986sk cells, *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription*, **14**(2), 67 (2006).
8. I. E. Collier, S. M. Wilhelm, and A. Z. Eisen, H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen, *J. Biol. Chem.*, **263**, 6579 (1988).
9. M. O. Longas, C. S. Russell, and X. Y. He, Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging, *Carbohydr. Res.*, **159**, 127 (1987).
10. I. Gheretich, T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, and G. Dini, Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging, *Int. J. Dermatol.*, **33**, 119 (1994).
11. Z. D. Hea, H. Donga, H. X. Xua, W. C. Yea, H. D. Sunb, and P. H. Paul, Secoiridoid constituents from the fruits of *Ligustrum lucidum*, *Phytochemistry*, **56**(4), 327 (2001).
12. R. S. Komsa-Penkova, R. K. Rashap, and V. M. Yomtova, Advantages of orange-labelled collagen and gelatin as substrates for rapid collagenase activity measurement, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **34**(3), 237 (1997).
13. K. H. Jung and H. J. Kim, Development of an agar diffusion method to measure elastase inhibition activity using elastin-congo red, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**(8), 1320 (2006).
14. Y. S. Lee, D. Q. Jin, S. M. Beak, E. S. Lee, and J. A. Kim, Inhibition of ultraviolet-A-modulated signaling pathways by asiatic acid and ursolic acid in HaCaT human keratinocytes, *European Journal of Pharmacology*, **476**, 173 (2003).
15. K. Takadaa, T. Nakane, K. Masuda, and H. Ishii, Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoid acids, suppress TNF- α induced E-selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells, *Phytomedicine*, **17**, 1114 (2010).