

Preventive Effect of Natural Pigments Against Ultraviolet B-induced Cell Death in HaCat Cells

Jae Chung Lim^{1,#}, Chun Sik Bae^{1,#}, Soo Young Jeong², Hee-Ock Boo³, Seong-Jin Hwang⁴,
Seul-Ki Lim¹, Min-Jung Park¹, Jong-Chun Kim¹, Seong-Soo Kang¹,
Ho-Jae Han¹ and Soo-Hyun Park^{1,†}

¹Bio-therapy Human Resources Center, Animal Medical Center, Department of Veterinary Physiology,
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Hanbang Industrial Promotion Institutes, Jang Heung, Korea

³Department of Biotechnology, College of Nature Science, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

⁴Department of Biology, College of Nature Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Skin is a physical barrier against diverse injury and damages. Exposure to ultraviolet (UV) radiation causes detrimental skin injuries such as inflammation and cell death. The value of natural pigments could be applied to many usages including cosmetics. This study was conducted to examine the protective effect of natural pigments extracted from mulberry, balsam pear, purple-colored sweet potato, pehmannia root, gardenia fruit, and black rice against UV-induced cell death in HaCaT cells, human keratinocyte cell lines. In the present study, the exposure of 50 mJ/cm² UV-B for 24 hr induced cell death in HaCaT cells, which was prevented by the pretreatment of extracts of mulberry, balsam pear, purple-colored sweet potato, rehmannia root, gardenia fruit, and black rice. In addition, the exposure of 50 mJ/cm² UV-B for 24 hr also increased lipid peroxide (LPO) formation, compared to control in HaCaT cells, which was prevented by the pretreatment of extracts of mulberry, balsam pear, purple-colored sweet potato, rehmannia root, gardenia fruit, and black rice. In conclusion, the extracts of mulberry, balsam pear, purple-colored sweet potato, rehmannia root, gardenia fruit, and black rice prevented the UV-B-induced cell apoptosis via the inhibition of oxidative stress in HaCaT cells.

Key Words: Apoptosis, Keratinocytes, Natural pigments, Oxidative stress, Ultraviolet B

서 론

천연 색소란 자연계에 자연 상태에서 존재하는 색깔을 나타낼 수 있는 가시광선의 파장 영역인 350~750 nm 범위에서 파장을 흡수할 수 있는 유기 또는 무기화합물을 말한다. 천연 색소는 다시 생체 색소와 광물 색소로, 생체 색소는 다시 식물 색소와 동물 색소로 구분한다 (Cserhati et al., 2000). 이중 식물 색소는 식물의 색소를 직접 추출하여 사용되며 다양한 생리활성을 띠는 것으로

최근 문헌에 의해서 보고되고 있다 (Kanakis et al., 2007).

피부는 인간의 신체에서 가장 큰 기관으로 자외선 조사에 직접적으로 노출되는 유일한 기관이다 (Assefa et al., 2005). 자외선은 피부 세포에 여러 가지 자극을 일으켜 피부 손상을 일으키는데, 여러 자극 요인들 중 피부가 자외선에 노출이 되게 되면 산화적 스트레스가 유발되게 되는데 이때 어느 정도의 산화적 스트레스는 생체 안에 존재하는 항산화계에 의해 제거되지만 산화적 스트레스가 항산화계의 수준을 초과하여 제거되지 못하면 피부 세포의 DNA 변형과 기능 상실에 관여하여 피부 세포 사멸까지 유도한다는 보고가 되고 있다 (Isoir et al., 2006). 산화성 스트레스는 피부 세포 사멸 이외에도 피부 노화를 촉진시키는 것으로 보고되고 있다 (Burke, 2010). Kim 등 (2009)은 천연 색소인 안토시아닌이 항산화 능력이 있다고 보고하였다. Solovchenko과 Schmitz-Eiberger (2003)은 사과 과일의 피부의 플라보노이드가 자외선 차단 효과가

*접수일: 2011년 2월 10일 / 수정일: 2011년 3월 23일

채택일: 2011년 3월 24일

#첫 두 저자는 이 논문에 동등하게 주저자로 공헌하였다.

†교신저자: 박수현, (우) 500-757 광주광역시 북구 용봉동,
전남대학교 수의과대학 생리학교실

Tel: 062-530-2832, Fax: 062-530-2809

e-mail: parksh@chonnam.ac.kr

Table 1. The name and final concentration of natural pigments used in this study

Sample	Scientific name	Fraction	Solvent	Final conc.
Mulberry	<i>Cudrania tricuspidata</i>	Chlorophyll	Aceton	50 µg/ml
			EtOH	50 µg/ml
Balsam pear	<i>Momordica charantia</i>	Carotenoid	EtOH	50 µg/ml
Purple-colored sweet potato flour	<i>Ipomoea batatas Lam</i>	Anthocyanin	Water	500 µg/ml
Rehmannia root	<i>Rehmannia glutinosa</i>	Carotenoid	EtOH	500 µg/ml
Gardenia fruit	<i>Gardenia jasminoides var. grandiflora</i>	Flavonoid	Water	50 µg/ml
Black rice	<i>Oryza sativa L</i>	Anthocyanin	Water	500 µg/ml

있다고 발표하였다. Carotinoid의 대표적 물질인 β -carotene의 경우 자외선에 대한 방어 효과가 인정이 된다고 최근 보고되었다 (Dinkova-Kostova, 2008). 그러나 직접적인 피부 세포에서의 UV에 대한 천연 색소의 효능에 대한 보고는 이루어 지고 있지 않고 있다. 따라서 자외선 차단 효과가 있는 천연 색소 물질들을 규명하고 나아가 이들 천연 색소 물질들이 어떠한 기전을 통해 자외선 차단 효과가 있는지를 규명하는 것은 의미가 크다고 사료된다. 본 실험에서는 다양한 천연 색소 중 대표적으로 알려져 있는 뽕, 여주, 자색고구마, 지황, 치자 및 흑미 등이 UV에 의한 피부 각질 형성 세포 사멸에 차단 효과가 있는지를 알아보았고 나아가 이들이 산화성 스트레스와 관련되는지를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium(D-MEM)-nutrient mixture F-12 (D-MEM/F-12)와 Class IV collagenase은 Life Technologies (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. MTT assay kit, penicillin 및 streptomycin는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

천연 색소 시료 준비

본 실험에 사용한 천연 색소 소재는 녹색계 (뽕잎), 흑색계 (흑미), 적자색계 (자색고구마), 황색계 (지황), 청색계 (치자청) 등으로 6종을 선별하였으며, 치자청 색소를 제외한 모든 시료는 시료 20 g에 증류수 100 mL를 가하여 85°C에서 3시간 동안 2회 반복 추출하였다. 이후 Whatman No. 1에 여과한 후 동결건조기를 사용하여 Temp -60°C, vac. 10 mm Torr 조건하에서 동결 건조하여 미세한 밀도로 분말화한 것을 추출 시료로 사용하였고,

치자청 색소는 동결건조분말로 시판되는 제품을 구입하여 사용하였다. 모든 시료 추출은 각각의 용매에 녹여 사용하였다.

HaCaT (피부 각질 형성) 세포 배양

피부 각질 형성 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 이들 세포들은 5% Fetal bovine Serum (FBS)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's 배지 (Life Technologies, Grand Island, NY)에 배양하였다. 이들 세포들이 70% confluence 되었을 때 세포성장을 정지시키기 위해 무혈청 배지에서 이들을 배양하여 세포의 성장을 동기화 시켜서 실험에 이용하였다.

MTT 측정

천연 색소의 UV에 의한 피부 각질 형성 세포 사멸 차단 효과를 측정하기 위하여 MTT 환원 실험을 실시하였다. 세포주를 96-well plate에 1×10^5 cells/mL의 농도로 100 µL씩 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 50 mJ/cm² UV-B를 24시간 조사하였다. 천연 색소에 의한 UV-B에 의한 피부 각질 형성 세포 사멸 차단 효과의 경우에는 Table 1에 나타난 농도를 30분 전 처리한 후 24시간 50 mJ/cm² UV-B를 노출시켰다. 반응 후 well 바닥에 형성된 formazan이 흩어지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 100 µL 첨가하여 ELISA reader (Model 680, BioRad, Hercules, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구 세포수를 100%로 하여 상대적인 세포성장 생존율을 구하였다.

Lipid peroxide (LPO) 형성

산화성 스트레스 지표인 LPO 형성은 Ohkawa 등 (1979)의 방법에 따라 malonaldehyde의 양으로 측정하였으며, 간략히 요약하면 다음과 같다. 세포들을 수확한

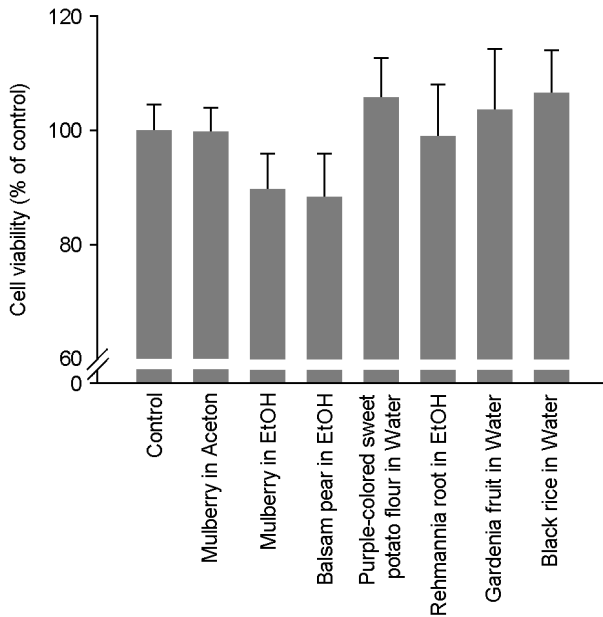


Fig. 1. Cytotoxic effect of natural pigments in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated with the extracts of Mulberry, Balsam pear, Purple-colored sweet potato flour, Rehmannia root, Gardenia fruit, and Black rice for 24 hrs. Then, MTT assay was conducted as described in 'Material & Method'. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures.

후 초음파로 세포를 분쇄한 후, 반응용액 [8% SDS 100 μ L, 0.8% 2-thiobarbituric acid (TBA) 200 μ L, 20% acetic acid 200 μ L]을 넣은 후 95 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 이후, 얼음으로 차게한 물에 식힌 후, 비특이적인 적색 색소를 제거하기 위하여 n-butanol-pyridine 혼합액 (15:1, v/v)을 첨가한 후 4,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수합하였다. 이 시료를 spectrofluometry (emission 파장 553 nm, excitation 파장 515 nm)로 측정하여 nmol/mg 단 백질로 표시하였다.

통계처리

실험결과의 통계적 처리는 Student's *t* test 및 Analysis of Variance (ANOVA)로 하였으며, *P* 값 < 0.05을 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 means \pm S.E 로 하였다.

결 과

천연 색소의 피부 세포 자외선 차단 효과

피부 각질 형성 세포에서 천연 색소 자체가 세포 사멸에 미치는 영향을 살펴보았다. 실험결과 천연 색소 자체

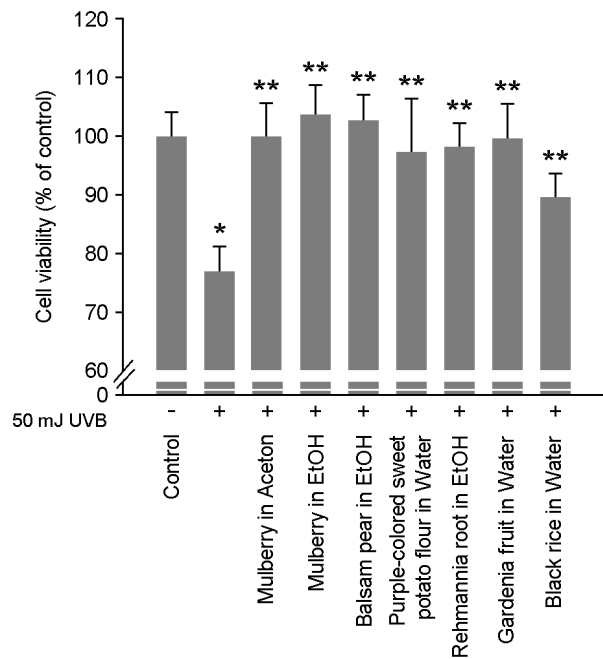


Fig. 2. Effects of Mulberry, Balsam pear, Purple-colored sweet potato flour, Rehmannia root, Gardenia fruit, and Black rice against UV-induced decrease of cell viability. HaCaT cells were incubated with the extracts of Mulberry, Balsam pear, Purple-colored sweet potato flour, Rehmannia root, Gardenia fruit, and Black rice for 30 mins prior to the exposure of ultraviolet B (50 mJ/cm²) for 24 hrs. Then, MTT assay was conducted as described in 'Material & Method'. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. **P*<0.05 vs. control, ***P*<0.05 vs. 50 mJ UVB exposure alone.

는 피부 각질 형성 세포 사멸에는 영향을 미치지 않았다 (Fig. 1). 피부 각질 형성 세포에서 천연 색소의 자외선에 의한 차단 효과를 알아보기 위하여 천연 색소를 30분 전 처리 한 후 UV-B를 50 mJ/cm²로 24시간 처리하였다. 실험 결과 UV-B를 50 mJ/cm²로 24시간 처리 시 피부 각질 형성 세포의 세포 사멸을 유의성 있게 증가시켰다 (Fig. 2). 이러한 UV-B에 의한 세포 사멸은 빙잎 (50 μ g/ml, Aceton 및 Et-OH 용매 분획), 여주 열매 (50 μ g/ml, Et-OH 용매 분획), 자색고구마 (500 μ g/ml, 물용매 분획), 지황 (500 μ g/ml, Et-OH 용매 분획), 치자 (50 μ g/ml, 물용매 분획) 및 흑미 (500 μ g/ml, 물용매 분획) 추출물에 의해 유의성 있게 차단되는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

천연 색소의 피부 세포 자외선 차단 효과에 대한 산화성 스트레스 관련성

산화성 스트레스와의 관련성을 알아보기 위하여 lipid peroxide (LPO) 형성을 측정하였다. 피부 각질 형성 세포에서 천연 색소의 산화성 스트레스 발생 차단 효과를 알

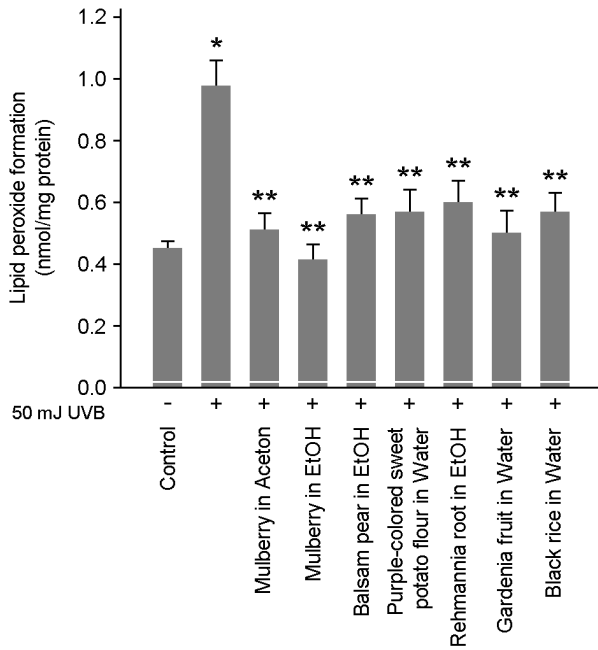


Fig. 3. Effects of Mulberry, Balsam pear, Purple-colored sweet potato flour, Rehmannia root, Gardenia fruit, and Black rice against UV-induced increase of lipid peroxidation (LPO) formation. HaCaT cells were incubated with the extracts of Mulberry, Balsam pear, Purple-colored sweet potato flour, Rehmannia root, Gardenia fruit, and Black rice for 30 mins prior to the exposure of ultraviolet B (50 mJ/cm²) for 24 hrs. Then, LPO assay was conducted as described in 'Material & Method'. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * P <0.05 vs. control, ** P <0.05 vs. 50 mJ UVB exposure alone.

아보기 위하여 천연 색소를 30분 전처리한 후 UV-B를 50 mJ/cm²로 24시간 처리하였다. 실험결과 UV-B를 50 mJ/cm²로 24시간 처리 시 LPO 형성은 증가하였으며 이러한 작용은 뽕잎 (50 μ g/ml, Aceton 및 Et-OH 용매 분획), 여주 열매 (50 μ g/ml, Et-OH 용매 분획), 자색고구마 (500 μ g/ml, 물용매 분획), 지황 (500 μ g/ml, Et-OH 용매 분획), 치자 (50 μ g/ml, 물용매 분획) 및 흑미 (500 μ g/ml, 물용매 분획) 추출물에 의해 유의성 있게 차단되는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

고 찰

피부 세포는 인체에서 일차적인 방어 역할을 하는 중요한 기관으로 자외선에 일차적으로 노출이 되어진다. 특히 자외선 조사의 경우는 인체에 있어 발색단 및 광감작을 통해서 심한 피부 세포들의 산화를 일으켜 손상을 야기시킨다 (Wlaschek et al., 2001). 본 실험에서는 이러한 UV-B에 의한 피부 각질 형성 세포 사멸을 차단할 수 있

는 다양한 천연 색소의 효능을 조사하였다. 특히 피부에 있어서 항산화 효과는 피부 노화 예방 등의 다양한 생리활성과 밀접한 관련이 있고 최근 천연 색소들과의 피부 세포들의 생리활성 평가에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 보고되어 (Masaki, 2010), 본 연구결과가 갖는 의미는 크다고 할 수 있다.

뽕은 학명이 *Cudrania tricuspidata*으로 클로로필계로서 간 보호 효과, 항염증 등의 여러 가지 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다 (An et al., 2006; Chang et al., 2008). 본 연구에서는 뽕잎 자체의 세포 독성은 일어나지 않았다. 이러한 결과는 Lee 등 (1996)이 이야기한 뽕의 줄기에서 분리한 dihydroflavonoids 계들이 피부 암세포에 독성을 일으킨다는 결과와는 상반된 결과를 보였다. 이는 세포의 차이 (CRL1579 vs. 각질 형성 세포)에 기인한 것으로 추측이 되며 피부 암세포는 사멸을 유도하지만 피부 각질 형성 세포에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료되어 그 중요성이 인식될 수 있을 것으로 판단된다. 더욱이 본 연구에서는 뽕잎 추출물이 UV-B에 의한 피부 각질 형성 세포 사멸을 차단하였다. Cho 등 (2003) 역시 뽕나무 추출액이 항산화 활성을 보인다고 하였다. 그럼에도 불구하고 피부 세포에서의 뽕나무의 생리활성 보고는 아직까지 이루어지고 있지 않고 있다. 본 연구결과에서는 피부 각질 형성 세포에서 뽕잎 추출물이 UV-B에 의한 산화성 스트레스를 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 향후 뽕잎을 이용한 천연 색소의 자외선 차단 기능성 화장품 개발에 중요한 단서가 될 것으로 판단된다.

여주 열매는 학명이 *Momordica charantia*으로 카로티노이드계 색소로 항암 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 이들은 당뇨 쥐의 피부에서 피부 손상 예방 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Teoh et al., 2009). Chaturvedi 등 (2009) 역시 알비노 랫트에서 움직임을 고정하여 스트레스를 유도하였을 때 여주 열매 전 처리 시 방어 효과가 인정된다고 하였다. 본 실험에서는 여주 열매 추출물이 UV에 의한 피부 세포 손상을 차단한다는 새로운 연구결과를 제시해주고 있다. 나아가 본 연구에서는 여주 열매 추출 천연 색소가 UV-B에 의한 산화성 스트레스 발생을 억제한다는 결과를 보여주었으며 이는 본 연구진이 아는 한 최초의 보고로 사료된다.

자색고구마는 학명이 *Ipomoea batatas Lam*이며, 자주색의 고구마에서 추출한 보라색 안토시아닌 색소로써 안정성과 색상이 우수하다. 본 연구에서는 자색고구마 추출물이 UV-B에 의한 피부 세포 사멸을 차단하였다. 나아가

본 실험에서는 자색고구마 추출물이 UV-B에 의한 산화성 스트레스 발생을 억제하였다. Chen 등 (2011) 역시 자색고구마에서 항산화 효소 물질이 분리되었다고 보고하여 본 연구결과를 뒷받침해주고 있다. 향후 자색고구마의 어떠한 성분이 이러한 세포 사멸 효과를 차단하는지를 알아보는 연구가 필요할 것으로 판단이 된다.

지황은 학명이 *Rehmannia glutinosa*으로 카로티노이드계 색소로 혈당 저하 효과가 있고 (Liu et al., 2008), 피부 생리활성면에서는 에탄올 추출물이 알려지 억제 효과가 있는 것으로 최근 알려져 있다 (Sung et al., 2011). 본 실험에서도 지황 에탄올 추출물이 UV에 의한 피부 세포 사멸 차단 효과가 있는 것으로 나타났다. 아울러 UV에 의한 산화성 스트레스의 감소를 통해 작용하는 것을 확인하였다.

치자는 학명이 *Gardenia jasminoides var. grandiflora*으로서 청색소와 적색소가 많이 사용되어지고 있으며 본 실험에서는 청색소가 이용이 되었다 (Sin, 2007). 최근 Hyung 등 (2010)이 털 없는 마우스에서 자외선 조사 시 피부 세포의 손상이 치자 추출물 처리에 의해서 증상이 완화되었다고 하여 본 연구에서 보였던 연구가 생체 실험에서도 재현될 수 있음을 말하고 있다.

본 실험에서 마지막으로 사용한 흑미의 경우는 학명이 *Oryza sativa L*인 안토시아닌계 색소로 항산화 능력이 강한 것으로 보고되었다 (Park et al., 2008). 아울러 흑미의 경우는 알콜에 의한 지방 간 손상 억제 및 고지혈증 예방 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Park et al., 2008; Hou et al., 2010). 그럼에도 불구하고 피부 세포에서의 흑미 효과는 거의 알려져 있지 않고 있다. 본 연구에서는 흑미 추출물이 UV-B에 의한 산화성 스트레스를 억제하여 피부 세포 사멸을 억제하고 있음을 말해주고 있다. 본 연구에서는 실험동물을 이용한 생체 실험을 실시하지 아니하였다. 이에 대한 생체 실험은 향후 연구에서 밝혀져야 할 사항으로 생각된다. 본 연구에서의 천연 색소의 경우 정도의 차이는 있었지만 대체적으로 UV-B에 의한 피부 세포 사멸을 차단하는 것으로 나타났으며 이러한 현상은 UV-B에 의한 산화성 스트레스 억제를 통하는 것으로 관찰되었다. 본 실험에서 사용된 천연 색소 추출물은 기초적인 안정성 확인에서 별다른 문제점을 보이지 않아 향후 항산화가 강화되는 자외선 차단 화장품 소재로서 활용 가능성이 있을 것으로 판단이 된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산물부 농림기술개발사업 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다. 또한 2010년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구이며 2010년 바이오하우징연구소의 지원을 받아 수행된 연구입니다. 전남대학교 동물의학 연구소에 의해서도 지원을 받아 수행한 논문입니다. 아울러 교육과학 기술부의 한국 연구재단 BK 21 사업의 대학원생 지원 프로그램에 의해 수행되었습니다. 이에 깊이 감사드립니다.

REFERENCES

- An RB, Sohn DH, Kim YC. Hepatoprotective compounds of the roots of *Cudrania tricuspidata* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Biol Pharm Bull.* 2006. 29: 838-840.
- Assefa Z, Laethem AV, Garmyn M, Agostinis P. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochim Biophys Acta.* 2005. 1755: 90-106.
- Burke KE. Photoaging: the role of oxidative stress. *G Ital Dermatol Venereol.* 2010. 145: 445-459.
- Chang SH, Jung EJ, Lim DG, Oyungerel B, Lim KI, Her E, Choi WS, Jun MH, Choi KD, Han DJ, Kim SC. Anti-inflammatory action of *Cudrania tricuspidata* on spleen cell and T lymphocyte proliferation. *J Pharm Pharmacol* 2008. 60: 1221-1216.
- Chaturvedi P. Bitter melon protects against lipid peroxidation caused by immobilization stress in albino rats. *Int J Vitam Nutr Res.* 2009. 79: 48-56.
- Chen CJ, Huang CY, Huang JK, Lin CY, Lin CT. Cloning, Expression, and Purification of a Functional Glutathione Reductase from Sweet Potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam): Kinetic Studies and Characterization. *J Agric Food Chem.* 2011. (in press)
- Cho EJ, Yokozawa T, Rhyu DY, Kim HY, Shibahara N, Park JC. The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their component compounds on lipid peroxidation. *Am J Chin Med.* 2003. 31: 907-917.
- Cserhati T, Forgacs E, Morais MH, Mota T. Liquid chromatography of natural pigments. *Biomed Chromatogr.* 2000. 14: 281-286.
- Dinkova-Kostova AT. Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: versatility of effects and mechanisms. *Planta Med.* 2008. 74: 1548-1559.
- Hou Z, Qin P, Ren G. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa L. Japonica*) on chronically alcohol-

- induced liver damage in rats. *J Agric Food Chem.* 2010. 58: 3191-3196.
- Hyung SH, Min KJ, Kim YC. Alleviating effect of *Gardeniae fructus* water extract on inflammation and skin-barrier damage. *The Journal of Cosmetological Science.* 2010. 6: 63-72.
- Isoir M, Buard V, Gasser P, Voisin P, Lati E, Benderitter M. Human keratinocyte radiosensitivity is linked to redox modulation. *J Dermatol Sci.* 2006. 41: 55-65.
- Kanakis CD, Tarantilis PA, Polissiou MG, Diamantoglou S, Tajmir-Riahi HA. An overview of DNA and RNA bindings to antioxidant flavonoids. *Cell Biochem Biophys.* 2007. 49: 29-36.
- Kim SH, Joo MH, Yoo SH. Structural identification and antioxidant properties of major anthocyanin extracted from Omija (*Schizandra chinensis*) fruit. *J Food Sci.* 2009. 74: C134-C140.
- Lee IK, Kim CJ, Song KS, Kim HM, Koshino H, Uramoto M, Yoo ID. Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *Phytochemistry.* 1996. 41: 213-216.
- Liu HR, Tang XY, Dai DZ, Dai Y. Ethanol extracts of *Rehmannia* complex (*Di Huang*) containing no *Corni fructus* improve early diabetic nephropathy by combining suppression on the ET-ROS axis with modulate hypoglycemic effect in rats. *J Ethnopharmacol.* 2008. 118: 466-472.
- Masaki H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J Dermatol Sci.* 2010. 58: 85-90.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979. 95: 351-358.
- Park YS, Kim SJ, Chang HI. Isolation and anthocyanin from black rice (*Heugjinjubyeo*) and screening of its antioxidant activities. *Kor J Microbiol Biotechnol.* 2008. 36: 55-60.
- Sin HJ. A trend in research and development of natural gardenia pigments. *Kor J Biotechnol Bioeng.* 2007. 22: 271-277.
- Solovchenko A, Schmitz-Eiberger M. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. *J Exp Bot.* 2003. 54: 1977-1984.
- Sung YY, Yoon T, Jang JY, Park SJ, Kim HK. Topical application of *Rehmannia glutinosa* extract inhibits mite allergen-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol.* 2011. (in press)
- Teoh SL, Latiff AA, Das S. The effect of topical extract of *Momordica charantia* (bitter melon) on wound healing in nondiabetic rats and in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Clin Exp Dermatol.* 2009. 34: 815-822.
- Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol. B* 2001. 63: 41-51.