

자외선이 조사된 섬유아세포에서 말채나무 잎추출물의 항산화작용

박현철, 정택규, 윤경섭*

Antioxidative Activity of Extract of *Cornus walteri* Wanger Leaves in Human Dermal Fibroblast Irradiated by UVB

Hyun-Chul Park, Taek Kyu Jung, and Kyung-Sup Yoon*

Received: 15 September 2014 / Accepted: 28 November 2014

© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: We investigated antioxidative activity of the ethanol extracts of leaves of *Cornus walteri* Wanger (CWE) by treated enzyme in human dermal fibroblast (HDFs) irradiated by UVB. We examined the *in vitro* chemical and cellular antioxidant activities of CWE in HDFs. We employed scavenging assay for the 1,1-diphenyl-2,5-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and cellular antioxidative activity of CWE, and we was investigated in H₂O₂-treated or UVB-irradiated HDFs. The CWE effectively scavenged DPPH radicals (IC₅₀ 7.03±0.4 µg/mL) when compared to the scavenging activities of L-ascorbic acid (IC₅₀ 4.69±0.3 µg/mL). CWE reduced UVB-induced cellular damage in HS68 cells by MTT assay and inhibited intracellular ROS generation in dose-dependent manner. In addition, CWE also attenuated the elevated levels of 8-isoprostane resulting from UVB-mediated oxidative stress. Collectively, these results suggest that CWE could be a new potential candidate as antioxidant against UVB-induced oxidative stress in HDFs.

Keywords: *Cornus walteri* Wanger, UVB-irradiation, Human dermal fibroblast (HDF), Antioxidative activity

1. INTRODUCTION

피부는 인체의 가장 큰 기관으로서 외부에 노출되어 있어 외부 자극으로부터 신체를 보호하는 역할을 한다. 여러 외부 자극 중 자외선은 광노화를 유발시키는 가장 큰 원인으로 알려져 있다. 자외선은 파장에 따라 UVA (320~400 nm), UVB (280~320 nm), UVC (200~280 nm)로 구분되며, 이 중 지표면에 도달하여 인체에 영향을 주는 자외선은 UVA와 UVB로 알려져 있다. 특히 UVB의 일부는 표피를 투과하여 진피의 유두층까지 도달하여 피부각화를 지속시키고 홍반 반응, 일광화상 (sunburn), 색소침착을 유발하여 광손상, 피부암 등을 일으킨다 [1]. 자외선은 피부내로 흡수되어 활성산소를 생성한다 [2]. 이들 활성산소는 세포의 구성성분인 단백질, 지질, 당, DNA 등에 비선택적, 비가역적인 작용을 함으로써 세포 사멸뿐만 아니라 피부암을 유발하게 한다 [3,4]. 활성산소 (ROS, reactive oxygen species)는 쌍을 이루지 않은 전자가 불안정한 상태로 되어 있는 강력한 산화제로서 대표적으로 O²⁻ (superoxide radical), H₂O₂ (hydrogenperoxide), OH⁻ (hydroxyl radical), ¹O₂ (singlet oxygen)가 있다. 이들은 인체 내에서 화학적 또는 효소적 반응에 의해 생성되고 있다 [5,6]. 피부세포에서 이와 같은 유해 활성 산소종은 항산화 효소와 비효소적인 항산화제들로 구성되어 있으나 산화적 스트레스는 ROS가 세포 내의 항산화 효소 사이에 상호작용하는 능력을 초과할 때 형성된다. 산화적 스트레스는 광손상에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다 [7,8]. 따라서 자외선 등으로부터 피부 세포를 보호하고 노화를 예방하기 위해서 활성산소로 인한 산화적 스트레스를 억제하고, 활성산소를 제거할 수 있는 항산화 효능을 가진 천연물질에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다 [9].

(주)사임당화장품 기술연구소
Saimdang Cosmetics Co., Ltd., R&D Center, Cheongwon 363-886, Korea
Tel: +82-43-218-4203, Fax: +82-43-218-4204
e-mail: ksyoonjh@hanmail.net

말채나무 (*Cornus walteri* Wanger)는 층층나무과에 속하는 낙엽교목으로 잎은 호생하며 넓은 난형 또는 타원형이고 꽃은 6월에 피며 열매는 둥글고 9~10월에 흑색으로 익는다 [10, 11]. 한방에서는 말채나무의 가지와 잎을 모래지엽 (毛棘枝葉)이라 하여 설사를 멈추거나 옷독을 치료하는데 사용하고 있으며, 민간에서는 말채나무 추출물을 살 빼는데 사용하였다. 말채나무의 생리활성 성분은 Choi 등이 말채나무껍질에서 gallic acid, (+)-gallocatechin, (+)-catechin, quercetin, quercitrin, rutin, isoquercitrin, hyperoside와 같은 8종의 phenol성 화합물을 분리 및 동정하였다 [12]. Lim 등은 말채나무 에탄올 추출물이 식후 혈당상승을 억제하고 체중을 감소한다고 보고하였다 [13]. 또한 Park과 Cha는 지질개선 효과와, 간장내 항산화효소 및 항염증 활성에 효과를 나타내어 비만으로 인한 고지질 및 이와 관련된 대사성질환에 효능이 있을 것으로 보고했다 [14]. 그러나 자외선에 의한 산화적 스트레스 대한 피부세포의 보호효과에 대한 연구는 없어 본 연구자들은 말채나무잎 추출물을 이용하여 자외선에 조사된 피부세포에서 항산화 활성을 연구하게 되었다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료, 시약 및 기기

본 실험에 사용한 말채나무잎은 국내산으로 경기도 파주의 (주)지유본초로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지 및 시약은 Hyclone (Logan, USA), Sigma Aldrich (Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다. DCFH-DA, DPPH, L-ascorbic acid, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), H₂O₂는 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader, 형광분석 및 흡광도 측정은 BIO-TEK Instruments (Winooski, VT, USA)의 Synergy^{HT} microplate reader를 사용하였다.

2.2. 말채나무잎 추출물의 제조

건조된 말채나무잎 50 g을 분쇄한 후, 75% 에탄올 수용액 500 mL을 가하여 60~90°C에서 2 h 동안 가열추출하고 여과하였다. 이 추출과정을 2회 반복하고 농축하여 조추출물을 얻었다. 이 조추출물을 10% 에탄올 수용액에 다시 용해시키고 47°C에서 20 h 동안 Novozyme33095제품의 효소 (Novozyme, Denmark)를 가하여 배양하였다. 효소처리배양액을 여과하고 농축한 후, 고형분 대비 1:10의 비율로 물에 분산시킨 후, 동량의 에틸아세테이트를 가하고 분획, 농축하여 최종 추출물을 얻었다. 상기 추출물을 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 100 mg/mL로 용해시켜 스톡 용액을 제조하여 이용하였다.

2.3. 세포배양

세포주는 ATCC로부터 분양받은 HS68 cells을 사용하였으며, 세포배양에 사용된 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medi-

um: DMEM)는 10% fetal bovine serum (HyClone Lab., Logan, USA), 1% antibiotic antimycotic (100 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin, Life Tech Inc., NY, USA)을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

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

항산화 활성은 DPPH를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하는 방법을 활용하였다 [16]. 0.2 mM DPPH 메탄올 용액에 CWE를 각각의 농도로 메탄올에 희석하여 혼합하고, 실온에서 20분간 반응시킨 후 ELISA reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조구는 시료액 대신 메탄올을 넣었으며, DPPH 용액 대신 메탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH radical 소거율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율 (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

2.5. 세포 생존율 측정

본 실험에서 HS68 cells에 대한 시료의 처리농도를 결정하기 위해 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma] assay를 Mosmann의 방법 [15]을 변형하여 실시하였다. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다. HS 68 cells을 1×10⁴ cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 동안 부착시킨 후 혈청이 없는 배지로 갈아준 다음, CWE를 농도별로 처리하여 12 h 동안 더 배양하였다. 배양 후 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 확인하였다. 대조구는 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.6. MTT assay를 이용한 세포 손상 정도 측정

HS68 cells을 1×10⁴ cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하여 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 제거하고 PBS (phosphated buffered saline)로 세척하였다. PBS를 첨가한 다음 250 mJ UVB로 세포 손상을 유발하고 신선한 배양배지로 교체한 후 CWE를 처리하여 12 h 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 MTT 5 mg/mL 용액을 각 well에 처리하고 37°C에서 4 h 동안 반응시켰다. 배지를 제거한 후 DMSO를 넣어 형성된 formazan을 녹여서 ELISA 판독기를 이용하여 595 nm에서 측정하였다.

2.7. 세포내 ROS 측정

세포 내 ROS 측정은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)가 세포 내로 투과된 후 아세틸기가 유리된 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH)의 형태에서 ROS와 반응하여 형광물질을 생성하는 성질을 이용하였다 [17]. H₂O₂ 처리 섬유아세포에서의 ROS를 측정하기 위해, 세포를 24 well plate에 4×10⁴ cells/well 농도로 분주하고 안정화시킨 후 serum이 없는 DMEM 배지로 교체하고 500 μM H₂O₂와 CWE를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12 h 배양하였다. 배양된 세포는 10 μM DCFH-DA이 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양한 후 HBSS로 DCFH-DA를 3회 씻어낸 후 fluorescence microplate reader (Bio-Tek instrument, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광을 측정하였다.

또한 UVB가 조사된 피부세포에서의 ROS를 측정하기 위해서 상기 방법과 동일한 방법으로, 250 mJ UVB로 조사한 후 CWE를 처리한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12 h 동안 배양시켰으며, 10 μM DCF-DA가 첨가된 DMEM 배지를 가하고 30분 후 DCF를 측정하였다.

2.8. Lipid peroxidation 측정

지질의 과산화반응 (lipid peroxidation)은 250 mJ UVB로 조사한 후 CWE를 처리한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12 h 동안 배양시킨 배양액으로부터 분비되는 8-Isoprostane의 양을 시판중인 효소 면역분석 키트 (enzyme immunoassay, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 제조사 설명서에 따른 비색정량법 (colorimetric determination)을 통해 측정하였다 [18].

2.9. 통계처리

모든 실험 결과는 평균±오차 (mean±SE)로 표기하였고 통계 처리는 Student's *t*-test로 검정하였고 대조군과 비교하여, *p*<0.05인 경우 *, *p*<0.01인 경우 **로 유의성이 있다고 표시하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. DPPH free radical 소거 효과

DPPH는 안정적인 자유 라디칼로 cystein, glutathione 같은 황아미노산과 ascorbic acid 등에 의해 diphenylpicrylhydrazine로 환원되어 보라색에서 무색으로 변하는 원리를 이용한 항산화 활성 측정에 유용한 방법이다 [19]. CWE와 양성대조군인 L-ascorbic acid의 DPPH radical 소거능 (IC₅₀) 측정 결과는 Table 1과 같다. DPPH radical 50% 저해하는 CWE의 농도는 7.03±0.4 μg/mL이었으며 L-ascorbic acid는 4.69±0.3 μg/mL이었다. DPPH radical 소거법은 전자 공여능을 통해 소거하는 기전으로써 Kim 등은 식물 추출물 및 플라보노이드류가 전자 공여능을 통한 항산화 활성에 기여한다고 보고하였다

Table 1. DPPH radical scavenging activity inhibition concentration (IC₅₀) of CWE

Sample	DPPH ¹⁾ Radical scavenging Concentration
	IC ₅₀ ²⁾ (μg/mL)
CWE	7.03 ± 0.4
L-ascorbic acid	4.69 ± 0.3

¹⁾DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.

²⁾IC₅₀: Inhibitory concentration for 50% reduction of DPPH.

[20,21]. CWE에서도 플라보노이드의 성분이 함유하고 있어 전자 공여를 통하여 항산화 효과가 있는 것으로 사료된다.

3.2. 세포 생존율에 미치는 영향

섬유아세포인 HS68 cells에서 CWE의 처리가 세포증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 이용한 세포생존율을 측정하였다. CWE 처리군은 세포생존율이 50 μg/mL까지 HS68 cells의 세포 독성에 영향을 미치지 않는 것으로 확인하였다. 따라서 50 μg/mL 농도 이하에서 항산화관련 실험을 진행하였다 (Fig. 1).

3.3. UVB에 의한 세포사멸 억제 효과

자외선에 대한 피부세포 보호효능을 평가하기 위하여 MTT assay를 이용하여 살아있는 세포를 확인하였다. 본 실험에서는 UVB를 이용하여서 섬유아세포를 손상시킨 후 CWE 처리 농도에 따른 세포 생존 정도를 MTT 시약을 이용하여 측정하였다. 측정 결과, 자외선을 조사하지 않은 실험군을 기준으로 자외선만 조사한 군은 세포 생존율이 70%이나 CWE는 1, 20, 50 μg/mL로 각각 처리한 군의 세포 생존율은 77%, 87%, 93%로 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 2). 자외선은 세포에 조사되면 세포내 광증감제 (포르피린, 리보플라빈 등)를 통하여 자외선을 흡수하고 자유 라디칼을 발생시킨다. CWE의 경우 DPPH radical 소거 실험에서 항산화 효과가 있는 것으로 나타났으며 이로 인하여 자외선에 의해 발생된 활성산소를 제거하여 세포의 사멸을 억제한 것으로 사료된다.

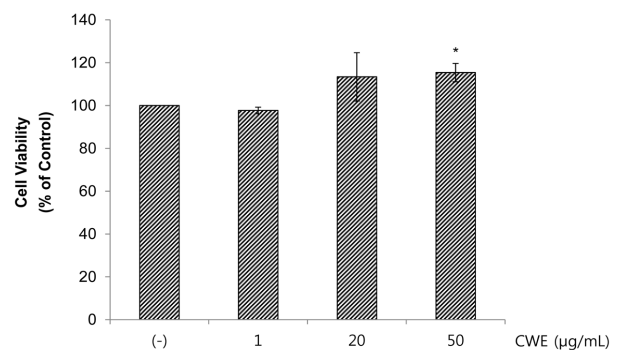


Fig. 1. The effect of CWE on the viability of HS68 cells. Cells were treated with indicated concentration of CWE for 12 h at 37°C. Cell viability was measured by MTT assay. Values are mean±S.E. **p*<0.05 compared to untreated group.

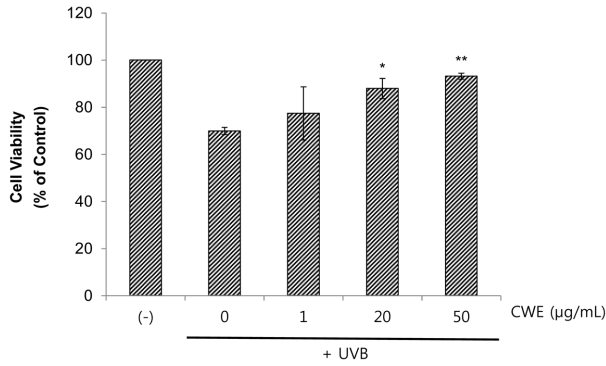


Fig. 2. Cell viability effect of CWE on UVB-induced cell damage in HS68 cells. The cell death ration were detected by MTT assay. Values are mean±S.E. **p*<0.05 and ***p*<0.01 compared to UVB untreated group.

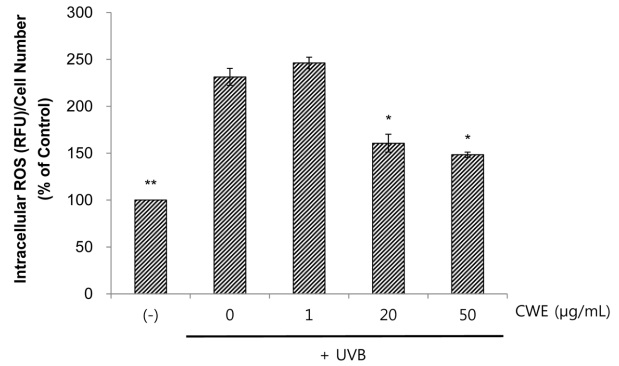


Fig. 4. Cellular antioxidant activity of CWE in UVB-induced oxidative stress in HS68 cells. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels generated by UV radiation were detected using a spectrofluorometer after DCF-DA staining. Values are mean±S.E. **p*<0.05 and ***p*<0.01 compared to UVB irradiated group.

3.4. H₂O₂로 산화적 스트레스 유도된 세포내 ROS 억제 효과

Table 1에서와 같이 *in vitro* DPPH radical 소거법에서 CWE의 항산화 활성을 확인하였고, 또한 자외선에 대한 세포 사멸도 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 CWE가 피부 섬유아세포에서 항산화 활성을 나타내는지를 확인하기 위하여 DCF 염색을 이용하여 형광분석기로 측정하였다. H₂O₂로 산화적 스트레스를 유도한 결과 대조군 (100%) 대비 확연하게 활성산소가 증가하였으나, 500 µM의 H₂O₂를 처리한 뒤 CWE를 1, 20, 그리고 50 µg/mL의 농도로 처리하였을 때는 농도 의존적으로 ROS를 억제하였다 (Fig. 3).

3.5. UVB로 산화적 스트레스 유도된 세포내 ROS 억제 효과

UVB가 피부세포에 조사되는 경우 H₂O₂ (hydrogen peroxide)와 같은 활성산소가 생성되며 [22], 발생한 H₂O₂는 이후 Fen-

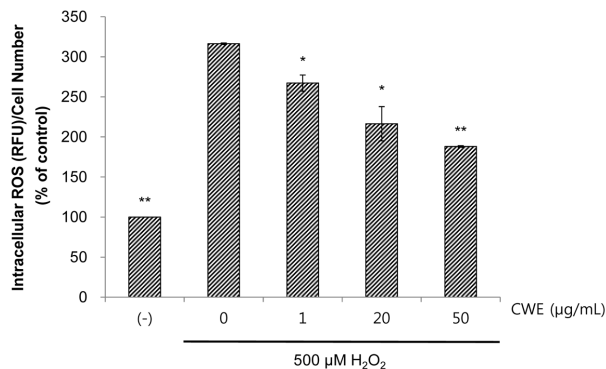


Fig. 3. Cellular antioxidant activity of CWE in H₂O₂-induced oxidative stress in HS68 cells. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels generated by H₂O₂ were detected using a spectrofluorometer after 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) staining. Values are mean±S.E. **p*<0.05 and ***p*<0.01 compared to H₂O₂ treated group.

ton reaction을 통해 매우 반응성이 강한 hydroxyl radical을 형성하게 된다 [23]. 따라서 CWE가 자외선 조사에 의해 일어나는 피부세포 내의 활성산소 생성 억제 효과를 알아보기 위해, 세포에 UVB를 조사한 후 CWE를 처리하여 12 h 배양하였다. UV만 조사한 군에서 세포 내 활성산소는 현저히 증가하였으며, CWE를 1, 20, 그리고 50 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 20, 50 µg/mL에서 각각 유의성 있게 ROS가 감소하였다 (Fig. 4). 이는 CWE의 항산화 소재로서의 가능성을 확인할 수 있는 결과로 사료된다.

3.6. 과산화지질 억제 효과

세포막을 구성하고 있는 지질성분은 ROS에 의해 과산화반응을 일으키며 8-isoprostane, 4-hydroxynonenal, malondialdehyde등의 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 자외선에 의한 섬유아세포의 세포막 지질과산화 억제 활성을 8-Isoprostane의 변화를 통하여 살펴보았다.

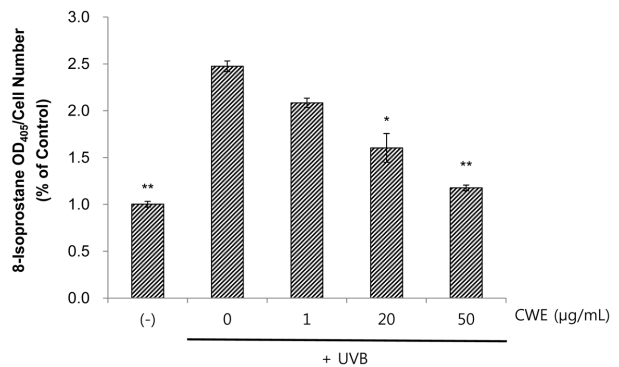


Fig. 5. Modulation of UVB-induced lipid peroxidation by CWE. HS68 cells were irradiated with UVB and then treated with CWE for 12 h. The lipid peroxidation was assayed by measuring the levels of 8-isoprostane secreted into the culture medium. Values are mean±S.E. **p*<0.05 and ***p*<0.01 compared to UVB irradiated group.

CWE를 이용한 지질 과산화 억제 활성의 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 CWE 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 생성 저해효과가 나타났고, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 약 52%의 8-isoprostane 생성을 억제하였다. 이는 DPPH radical 소거 활성 및 세포내 활성산소 소거가 농도 의존성 있게 나타난 것과 관계가 있는 것으로 사료된다.

4. CONCLUSION

자외선 조사에 의한 피부세포에서의 항산화 효과를 인간섬유아세포에서 실시하였다. DPPH radical 소거활성이 우수하게 나타났으며 피부세포에서 자외선에 대한 CWE의 피부보호 효과 실험을 실시한 결과 자외선에 의한 세포사멸 억제와 세포내 ROS 저해 효과가 우수하게 나타났다. 또한 이러한 항산화 효과로 인하여 지질과산화 생성도 감소하게 나타났다. CWE의 항산화에 관련된 본 연구결과를 종합해 볼 때 다양한 페놀성 화합물을 함유한 CWE는 항산화 및 자외선에 의한 산화적 스트레스로 인한 세포손상을 회복시킬 수 있는 기능성 바이오 산업 소재로서의 활용 가치가 높다고 사료된다. 향후에는 UVB에 의한 세포자연사 (apoptosis) 및 DNA 손상에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제고유번호: HN10C0004).

REFERENCES

1. Matz H. (2007) UV light and its interaction with cutaneous receptors. *Dermatol. Clin.* 25: 633-641.
2. Bryce, G F. (1993) *The effects of UV radiation on skin connective tissue, in oxidative stress in dermatology.* pp. 105-125, Marcel Dekker, Inc., N. Y.
3. Kang S., S. Cho, J. H. Chung, C. Hammerberg, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees (2005) Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in inflammatory acne lesions in vivo. *Am. J. Pathol.* 166: 1691-1699.
4. Matsumura Y., and H. N. Ananthaswamy (2004) Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195: 298-308.
5. Halliwell B., and O. I. Aruoma (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281: 9-19.
6. Crispo J. A., M. Pich, D. R. Ansell, J. K. Eibl, I. T. Tai, A. Kumar, G. M. Ross, and T. C. Tai (2010) Protective effects of methyl galate on H_2O_2 -induced apoptosis in PC12 cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 393: 773-778.
7. Reuter S, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, and B. B. Aggarwal (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 49: 1603-1616.
8. Afaq, F., and H. Mukhtar (2006) Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental Dermatology* 15: 678-684.
9. SvobodovA, J. Psotov, and D. Walterov (2003) Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. *A review. Biomed. Papers* 147: 137-145.
10. Lee C. B. (1989) *Coloured Flora of Korea*, pp. 594 Hyangmunsa, Seoul.
11. Lee W. G (1996) *Coloured Standard Illustrations of Korean Plants*, pp. 249 Dosuh Press, Seoul.
12. Choi W. H., W. Y. Park, B. Y. Hwang, G. J. Oh, S. J. Kang, K. S. Lee, and J.S. (1998) Ro Phenolic compounds from the stem bark of *Cornus walteri* Wnager, Kor. *J. Pharmacogn.* 29: 217.
13. Lim C. S., C. Y. Li, Y. M. Kim, W. Y. Lee, and H. I. Rhee (2005) The inhibitory effect of *Cornus walteri* extract against α -amylase. *J. Korean Soc Appl. Biol. Chem.* 48: 103-108.
14. Park, W. H. and Y. Y. Cha (2009) Effect of stem bark extracts of *Cornus walteri* Wanger on the lipid lowering, anti-oxidative activity and concentration of proinflammatory cytokines in rat fed high fat diet. *J. Oriental Rehab. Med.* 19: 59-78.
15. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods* 65: 55-63.
16. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
17. Rosenkranz, A. R. S. Schmaldienst, K. M. Stuhlmeier, W. Chen, W. Knapp, and G. J. Zlabinger (1992) A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J. Immunol. Methods* 156: 39-45.
18. Beauchamp, M. C., E. Letendre, and G. Renier (2002) Macrophage lipoprotein lipase expression is increased in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* 43: 215-222.
19. Sanchez-Moreno, C. (2002) Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* 8: 121-137.
20. Kim G. N. and H. D. Jang (2011) Flavonol content in the water extract of the mulberry (*Morus alba* L.) leaf and their antioxidant capacities. *J. Food Sci.* 76: C869-C873.
21. Oh C. H., G. N. Kim, S. H. Lee, J. S. Lee, and H. D. Jang (2010) Effects of heat processing time on total phenolic content and antioxidant capacity of ginseng Jung Kwa. *J. Ginseng Res.* 34: 198-204.
22. Peus D., R. A. Vasa, A. Meves, M. Pott, A. Beyerle, K. Squillace, and M. R. Pittelkow (1998) H_2O_2 is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 110: 966-971.
23. Thomas C, M. M. Mackey, A. A. Diaz, and D. P. Cox (2009) Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep.* 14: 102-108.