

## 금은화 물추출물의 항산화 효과와 Ultraviolet(UV)B로 유도된 사람 각질형성세포 손상에 대한 보호효과

서승희<sup>1#</sup>, 배기상<sup>2</sup>, 최선복<sup>3,4</sup>, 조일주<sup>3,4</sup>, 김동구<sup>3,4</sup>, 신준연<sup>3,4</sup>, 송호준<sup>3,4</sup>, 박성주<sup>2,3,4</sup>, 최미옥<sup>5\*</sup>

1 : 동신대학교 뷰티미용학과, 2 : 원광대학교 한방체액조절연구센터, 3 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실,  
4 : 원광대학교 한의학전문대학원 BK21 플러스팀, 5 : 광주여자대학교 미용과학과

### The antioxidative and cytoprotective effect of *Lonicerae japonicae* Flos water extracts on the ultraviolet(UV)B-induced human HaCaT keratinocytes.

Seung-Hee Seo<sup>1,#</sup>, Gi-Sang Bae<sup>2</sup>, Sun Bok Choi<sup>3</sup>, Il-Joo Jo<sup>3,4</sup>, Dong-Goo Kim<sup>3,4</sup>,  
Joon-Yeon Shin<sup>3,4</sup>, Ho-Joon Song<sup>3,4</sup>, Sung-Joo Park<sup>2,3,4</sup>, Mee-Ok Choi<sup>5,\*</sup>

1 : Department of Cosmetology, Dongshin University, Naju, Jeonnam, South Korea,

2 : Hanbang Body-Fluid Research Center, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, South Korea,

3 : Department of Herbology, School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, South Korea,

4 : BK21 Plus Team, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, South Korea,

5 : Department of Beauty Science, Kwangju Women's University, Kwangju, South Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : *Lonicerae japonicae* Flos(LJF) has been reported to exhibit anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-viral, anti-rheumatoid properties. However, it is still largely unknown whether LJF inhibits the ultraviolet(UV)B-induced oxidative damage in human HaCaT keratinocytes. Therefore in this paper, we investigated the anti-oxidative capacity and protective effect of LJF against UVB-induced oxidative damage in human HaCaT keratinocytes.

**Methods** : To evaluate the anti-oxidative activity of LJF extracts, we measured total phenolic contents, total flavonoid contents, antioxidant capacity, and superoxide scavenging activity. To give an oxidative stress to HaCaT cells, UVB was irradiated with 200 mJ/cm<sup>2</sup> to HaCaT cells. To detect the protective effect of LJF against UVB, we measured cell viability, DNA fragmentation and reactive oxygen species (ROS) production. In addition, we performed high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis to find a major component of LJF.

**Results** : LJF contained phenolic and flavonoid contents, and showed the anti-oxidant and superoxide scavenging activity. The UVB-induced oxidative conditions led to the cell death, DNA fragmentation and reactive oxygen species (ROS) production. However, pretreatment with LJF reduced oxidative conditions, including inhibition of cell death, DNA fragmentation and ROS production. In addition, we found out chlorogenic acid as major component of LJF.

**Conclusions** : These results could suggest that LJF contained anti-oxidative contents and exhibited protective effects against UVB on human HaCaT keratinocytes. And the effective compound of LJF which could show protective activities against UVB is chlorogenic acid. Thus, LJF and chlorogenic acid would be useful for the development of drug or cosmetics treating skin troubles.

**Key words** : HaCaT keratinocytes, *Lonicerae japonicae* Flos, UVB(ultravioletB), Reactive Oxygen Species (ROS), chlorogenic acid

### 서론

피부는 크게 표피, 진피, 피하조직으로 구성되어 있으며 체온 조절, 보습, 감각작용, 방벽작용, 분비 및 배설작용, 호흡작용,

흡수작용, 영양소 저장 및 비타민 D합성 등 다양한 생리작용을 함으로써 정상적인 피부를 유지하는데 주된 작용을 하고 있다<sup>1)</sup>. 하지만 피부 표피에 해당하는 각질형성세포(keratinocytes)는 태양광선(자외선)을 비롯한 외부 자극에 직접적으로 노출되는

최외각 층으로서 반복적으로 많은 양의 자외선에 노출되면 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유도하여 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성 된다<sup>2)</sup>. 자외선으로 유도된 활성산소종은 피부의 광산화적 손상을 유도하여 노화를 가속화시킨다. 피부에 직접적으로 영향을 주는 자외선은 표피와 진피 층까지 투과하며 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직에 활성 산소를 생성 시킨다<sup>3)</sup>. 생성된 활성산소는 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어체계의 불균형을 발생시키고 지질 과산화로 인한 세포막의 손상으로 정상적인 세포의 기능을 하지 못하게 된다. 그로 인해 피부는 지속적인 산화 상태에 회복되지 못하게 되면서 표면이 거칠고 윤기가 없어지면서 탄력 저하나 주름 발생과 같은 피부 노화 현상이 표출 된다<sup>4)</sup>. 따라서 산화적 스트레스(oxidative stress)로부터 각질형성세포를 보호하고 노화를 지연시키기 위해서는 체내 항산화 방어 시스템을 향상시키는 것이 매우 중요하다<sup>5)</sup>. 이에 따라 자외선으로부터 피부를 보호하기 위하여 자외선의 피부 침투를 차단 시키거나, ROS를 조절하여 피부 손상에 따른 염증을 막고 활성산소를 제거하는 자외선 차단제, 항염증, 항산화제 개발에 대한 관심이 증가하고 있다<sup>6-8)</sup>. 현재 연구되고 있는 항산화제는 크게 합성 항산화제와 천연 항산화제로 구분할 수 있는데, 최근에 몇몇 합성 항산화제와 관련한 위험성에 대한 보고로 인하여 효과적이면서도 독성이 없는 천연에서 얻어진 약용식물을 이용한 항산화제 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>9,10)</sup>. 특히 천연 약용식물의 추출물은 여러 약리적 효과과 더불어 항산화제로 작용할 수 있는 생리 활성 물질이 있어 유용한 연구의 소재가 되고 있다<sup>11)</sup>.

금은화(金銀花, *Lonicerae japonicae* Flos, LJF)는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동 덩굴(*Lonicera japonica* Thunb.)의 꽃으로서 한방에서는利尿, 淸熱解毒, 外感風熱, 熱毒癰疽, 健胃, 涼散風熱, 癰腫精瘡, 喉痹, 丹毒, 熱血毒痢, 風血感冒, 溫炳發熱 등에 효능을 갖고 있는 본초이다.금은화에 대한 최근 연구 동향 분석에 따르면 감염성 질환, 외이도염, 화농증, 중이염, 바이러스성 결막염, 인플루엔자, 폐렴 등의 염증성 질병에 사용되고 있다<sup>12,13)</sup>. 뿐만 아니라 항균, 항바이러스 효과<sup>14)</sup>, 항산화 효과<sup>15)</sup>, 간 보호 효과<sup>16)</sup>, 항암효과<sup>17)</sup>, 면역증진효과<sup>18)</sup> 등이 있으며, 그 외에 혈소판활성 및 코카인 중독, 망막허혈 등에 이르기까지 폭넓은 분야에 걸쳐 연구가 이루어지고 있다<sup>19)</sup>. 그동안 진행된 연구 결과들에 의하면 다양한 용매에 추출된 금은화의 성분들은 chlorogenic acid, saponins, tannin계, flavonoid계의 luteolin, lonicerin, apiogenin, quercetin, ochnaflavone, astragalins 등이 배당체로 존재하는 것으로 알려져 있고, 이에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있다<sup>20,21)</sup>. 이와 같이 다양한 효능을 지니고 있는 금은화에 대한 약리학적 작용과 임상적 이용가치에 대해서는 다수의 정보가 있으나, HaCaT Keratinocyte 사람 각질형성 세포에서 금은화를 이용한 항산화 효과에 대한 연구는 본 연구진의 연구 외에는 미흡한 실정이다<sup>22)</sup>. 따라서, 본 연구는 금은화 물 추출물에 의한 항산화 능력 조사와 Keratinocyte에

서 UVB로 유도된 산화적 손상에서의 세포 보호효과에 대해서 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용한 금은화는 음니허브(경북 영천, 대한민국)에서 구입하여 정선해서 사용하였다.

#### 2) 세포주 및 배양

본 실험에 사용된 HaCaT 세포는 Addexbio (San Diego, California, USA)로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 각질형성세포주인 HaCaT 세포주를 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GibcoBRL, Braunschweig, Germany) 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 세포 배양기에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 약물 추출

실험에 사용된 금은화 100g을 1L에 약탕기(대웅, 한국)로 100°C에서 3시간 가열 추출한 다음 여과한 후, 동결 건조하여 금은화 17.4g의 건조 분말을 얻었으며, 실험을 위하여 4°C에 보관했다. 실험 시에는 증류수에 녹여 stock solution (100 mg/ml)을 제조하였다. 제조된 stock solution은 -20°C에 보관하면서 분석방법에 적합하도록 희석하여 사용하였다.

#### 2) UVB 조사

세포의 자외선 조사는 300~315 nm를 가장 강하게 방출하는 UVB lamp 306 nm (동서과학, 한국)를 사용하였으며, UV 광량은 UVA/UVB light meter 850009(Sper scientific, Scottsdale, AZ, USA)로 측정하였다. UVB의 조건을 잡기 위해서 DMEM 배지를 제거한 다음, Phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS)로 2번 씻어낸 후 자외선 조사 동안 세포가 건조되지 않도록 PBS 1 ml을 세포 배양 접시에 넣은 후 UVB를 선량별로 50, 100, 200, 300 mJ/cm<sup>2</sup>를 조사하였다. UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup>에서 조건이 잡힌 후 실험에서는 금은화 추출물 및 천연 추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml농도로 1시간 처리 한 후 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 조사하였다. PBS 1 ml로 1번 씻어 낸 다음 금은화 추출물 및 천연 추출물이 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml농도로 첨가된 배양액으로 갈아주었다. 세포는 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup>를 조사하고 4시간이 지난 후에 실험에 사용하였다.

\*Corresponding author : Mee-Ok Choi, Department of Beauty Science, Kwangju Women's University, Kwangju, South Korea  
· Tel : +82-61-330-3297 · E-mail : cmo0323@hanmail.net

#First author : Seung-Hee Seo, Department of Cosmetology, Dongshin University, Naju, Jeonnam, South Korea  
· Tel : +82-61-330-3297 · E-mail : ssh@dsu.ac.kr

· Received : 14 October 2014 · Revised : 3 November 2014 · Accepted : 11 November 2014

### 3) 세포 독성 분석

HaCaT cell의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 세포들은 DMEM 배지에서  $5 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 현탁하여 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도로 금은화 추출물 및 천연 추출물을 처리 하였다. 24시간 배양 후 5 mg/ml의 농도로 MTT 용액을 첨가 후 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO 200  $\mu$ l를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96well plate에 loading 한 후, 생성물을 DMSO로 녹여 생성된 크리스탈의 양을 spectrometer (molecular devices, CA, USA) 기기를 사용하여, 최대 세포 생존률을 반영하는 파장인 흡광도 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정 하였다.

### 4) 추출물의 성분분석

#### (1) 총 페놀 함량 측정

금은화 추출물 100  $\mu$ L(1 mg/mL)에 Folin-ciocalteau reagent 50  $\mu$ L를 가하고 5분간 상온에서 안정화 시킨 후 20% sodium carbonate 300  $\mu$ L를 가하고, 상온에서 15분 동안 안정화 시킨 후 증류수 1 mL를 넣어 혼합한 후에 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀화합물 함량은 표준물질 gallic acid를 이용하여 검량선을 작성한 다음 정량하여 GAE(gallic acid equivalents)로 나타내었다.

#### (2) 총 플라보노이드함량 측정

금은화 추출물 100  $\mu$ L(1 mg/mL)에 10% aluminum nitrate 20  $\mu$ L, 1 M potassium acetate 20  $\mu$ L 그리고 80% 에탄올을 860  $\mu$ L를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분 동안 안정화 시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 이용하여 검량선을 작성한 다음 QE(quercetin equivalents)로 나타내었다.

### 5) 추출물의 항산화 활성 측정

#### (1) 총 항산화능 측정

금은화추출물에 0.35 M acetate 완충용액과 0.89 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 용액 및 0.44 mM hydrogen peroxide 용액 등을 첨가하고, 혼합한 뒤 5분 후에 655 nm에서 흡광도를 측정 하였다. Trolox를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 작성하였고, 총 항산화능은 mM Trolox equivalent 로 표기하였다.

#### (2) Superoxide 소거활성 측정

금은화 추출물에 62  $\mu$ M nitroblue tetrazolium(NBT)와 98  $\mu$ M  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)를 함유한 20 mM Tris 용액(pH 8.0)을 혼합한 다음, 20 mM Tris 용액과 33  $\mu$ M phenazine methosulfate(PMS)를 각각 첨가하였다. 즉, 비효소적으로 PMS/NADH로 유발된 superoxide는 NBT를 자주색의 formazan으로 환원시키며, 생성된 formazan을 측정하기 위해 540 nm에서 10 분 동안 반응물의 흡광도를 측정하였다. 추출물의 superoxide 소거활성(%)은 다음과

같은 공식으로 구하였다.

$$\text{Superoxide scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가흡광도}}{\text{시료무첨가흡광도}}\right) \times 100$$

### 6) 형광 유세포 분석 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)

#### (1) ROS 생성도 분석 (dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA)

세포 내 활성 산소의 생성을 측정하기 위하여 형광 prob는 DCF-DA(Sigma, MO, USA)를 이용 하였다. HaCaT 세포에 금은화 추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml농도로 1시간 전 처리 한 후 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup>를 조사한 후 4시간 동안 배양 하였다. 세포를 수확하기 전에 10  $\mu$ M DCF-DA를 처리 하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 배양하였다. 배양한 세포는 PBS로 세척 하여 1% Trypsin-EDTA(Sigma, MO, USA) 용액을 처리하여 세포를 수확하고 다시 PBS로 세척하여 flow cytometry (FACS CALibur, BD Biosciences)로 형광을 측정하였다. 정보의 분석은 Cell Quest software (Becton Dickinson)를 이용하였다.

### 7) 형광 현미경 분석 실험 (Flourescence microscopy)

#### (1) DNA 염색 분석 (4',6-diamidino-2-phenylimdole, DAPI)

HaCaT 세포에 금은화 추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml로 전처리한 후 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 조사 후 4시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척 후 4% paraformaldehyde 용액으로 30분 동안 실온에서 고정하고 PBS로 3회 세척하였다. 세포의 핵은 DAPI (Sigma, MO, USA) (10 mg/ml) 사용하여 5분간 염색하고 PBS로 3회 세척하였고, prolong gold anti-fading mount solution (invitrogen, CA, USA)를 이용하여 마운팅 하였다. 그 후 Flourescence microscopy (Olympus X 70, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

### 8) DNA 분절 측정

#### (1) 세포 DNA분절 샘플 준비

Cellular DNA fragmentation Kit (Millipore, MA, USA)를 이용하여 DNA의 분절 정도를 측정하였다. 먼저 HaCaT 세포를  $2 \times 10^5$  cells/ml로 현탁하고, bradU labeling solution을 10  $\mu$ M을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 조건 하에서 2시간 배양 하였다. 그 후 250 g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 다음, 세포에 DMEM 배지를 각 200  $\mu$ l씩 첨가하여 96well plate에 넣어 주었다. HaCaT 세포에 금은화 추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml 농도로 처리 한 후 1시간 뒤 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 조사 후 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 조건하에서 1시간 배양하였다. 1시간 후에 96well plate를 250 g에서 10분간 원심 분리 후, 상층액을 제거 하였다. 96well plate 각 well에 1X incubation solution 200  $\mu$ l를 첨가한 후, 상온에서 30분간 배양하였다. 그 후 250 g에서 10분간 원심 분리하여 나온 상층액을 100  $\mu$ l 취하여 실험에 사용하였다.

## (2) 세포 DNA 분절 분석

96 well plate에 DNA coating solution 100  $\mu$ l를 첨가한 뒤, 4°C에서 overnight하였다. 현탁액을 털어내어 버린 뒤, 1X incubation solution 200  $\mu$ l를 첨가하여 상온에서 30분간 blocking 하였다. 그 후, washing buffer 200  $\mu$ l를 첨가하여 3회 씻어낸 다음, exonuclease III solution 100  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 denaturing 하였다. washing buffer 200  $\mu$ l를 첨가하여 3회 씻어 낸 다음, anti-Brad-POD conjugate solution을 각 well에 100  $\mu$ l씩 첨가하여 4°C에서 overnight하였다. 그 후, washing buffer 200  $\mu$ l를 첨가하여 3회 씻어낸 다음, substrate solution 100  $\mu$ l를 첨가해 DNA가 분절된 정도를 370 nm에서 spectrometer를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 결정하였다.

## 9) High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

본 연구에서 사용한 금은화 추출물과 화합물은 HPLC를 사용하여 함유 성분의 패턴을 분석하였다. 사용한 HPLC 장치는 YL9100 system (Younglin, Korea)이었으며, 컬럼은 YMC-Triart C18 (4.6 $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m) 을 사용하였다. 이동상은 MeOH, (JT Baker, 영국), 0.1% formic acid in water 를 사용하였으며, 온도는 실온이었으며, 유속은 분당 0.7ml 이었다. 크로마토그램은 YL9100 UV/BIS Detector (Sykam, 독일)를 이용하여 254nm에서 검출하였다. 이동상 용매로는 MeOH과 water의 비율을 달리하여 처음 10분간 10%~20% MeOH 조성으로, 다음 10분~55분간 20%~70% MeOH 조성으로, 다음 55분~60분간 70%~100% MeOH 조성으로 총 60분간 변화시켰다. 실험에 chlorogenic acid는 sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 10) 통계 처리

실험 결과에 대한 통계 처리는 SPSS V10.0을 이용하여 one way ANOVA로 검정하여 P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

# 결 과

## 1. 금은화 물 추출물의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

금은화 추출물 0.1 mg/mL 농도의 총 페놀 함량은 1.10 mM gallic acid equivalent이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 총 페놀 함량도 비례적으로 증가하여, 0.25, 0.5 mg/mL 농도에서 각각 1.38, 2.09 mM gallic acid equivalent로 나타났다(Fig. 1A). 이는 금은화 물 추출물에 총 페놀 함량이 우수하게 포함되어 있음을 의미 한다. 또한, 금은화 물 추출물 0.1 mg/mL 농도의 총 플라보노이드함량은 0.1 mM quercetin equivalents이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 플라보노이드함량도 비례적으로 증가하여, 0.25, 0.5 mg/mL 농도에서 각각 0.83, 1.2 mM quercetin equivalent로 나타났다(Fig. 1B). 금은화 물 추출물의 농도가 증가 할수록 quercetin equivalents의 mM이 증가 하는 경향이 나타났으

며, 이는 금은화 물 추출물에 플라보노이드가 함유 되어 있음을 알 수 있다.

## 2. 금은화 물 추출물의 총 항산화능 및 superoxide 소거활성 효과

금은화 추출물 0.1 mg/mL 농도의 총 항산화능은 0.70 mM Trolox equivalent이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 총 항산화능도 비례적으로 증가하여, 0.1, 0.25 및 0.5 mg/mL 농도에서는 각각 0.70, 1.56 및 2.43 mM Trolox equivalent를 나타내었다. 반면에, 양성대조군으로 사용한  $\alpha$ -tocopherol의 총 항산화능은 0.1, 0.25 및 0.5 mg/mL 농도에서 각각 0.56, 1.22, 1.89 mM Trolox equivalent로 측정되었다(Fig. 1C). 따라서, 금은화 추출물의 총 항산화능 효과는  $\alpha$ -tocopherol 보다 우수함을 확인 하였다. 또한, 금은화 추출물 0.1 mg/mL 농도의 superoxide 소거활성은 11.4%이었으며, 추출물 농도가 증가함에 따라 소거활성도 증가하여, 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL 농도의 금은화 추출물의 superoxide 소거활성은 각각 11.4, 31.4, 44.5 %로 나타났다. 양성대조군으로 사용한 catechin의 superoxide 소거활성은 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL 농도에서 각각 16.0, 46.6, 70.9 %로 측정되었다(Fig. 1D).

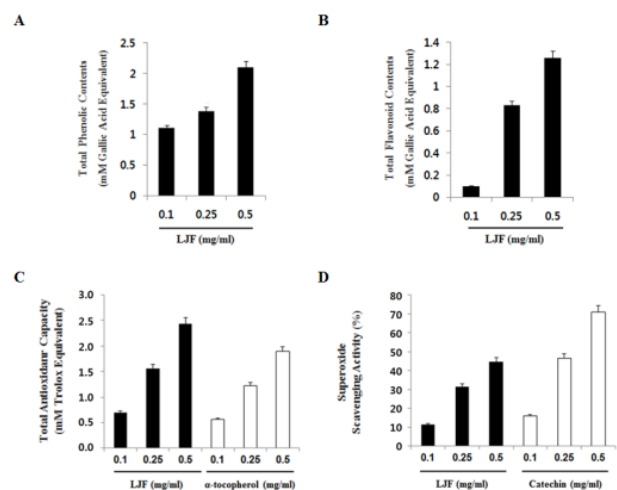


Fig. 1. The effects of LjF extracts on total phenolic content (A), total flavonoid contents (B), total antioxidant capacity (C), and superoxide radical scavenging activity (D). Data results were expressed as in terms of mM gallic acid equivalent (A). Data results were expressed as in terms of mM quercetin equivalent (B). Data results were expressed as in terms of mM and trolox equivalent (C). Data results were expressed as % inhibition of the activity (D). The data represent the mean  $\pm$  S.D. of 3 experiments.

## 3. 금은화 물 추출물이 사람 각질형성 세포에서 UVB로 유도된 독성에 대한 세포 보호 효과 및 DNA 손상에 미치는 영향

다음으로 금은화 물 추출물의 UVB로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하고자 하였다. HaCaT 세포에 금은화 물추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml 농도별로 처리하

여 1시간 동안 배양한 후 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 을 조사 후 4시간 처리 한 뒤 세포 생존율을 살펴보았다. 그 결과 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 을 조사 하였을 때 감소하던 세포 생존율이 금은화 물추출물 처리 군에서 농도 의존적으로 증가한 것을 확인 하였다. 아무것도 처리하지 않은 그룹의 생존율 100%에 비해 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 조사 시 52%의 세포 생존율을 보였으며, 금은화 물추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml로 전처리 시 72.22%, 76.31%, 77.01%로 생존율이 증가하는 것을 확인 하였다(Fig. 2). UVB 조사 후 나타나는 세포 DNA 손상에 금은화 물추출물이 주는 영향을 알아보기 위하여, 금은화 물추출물을 농도별(0.1, 0.25, 0.5 mg/ml)로 1시간 전 처리 하고, UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 조사 후 인큐베이터에서 4시간 배양 하였다. 그 결과 정상군에 비하여 대조군인 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 처리 군에서 DAPI의 응집, 즉 핵의 응축이 일어나는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 금은화를 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml을 처리 하였을 때 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 처리로 인한 핵의 응축이 유의하게 감소되는 것을 확인 하였다(Fig. 3).

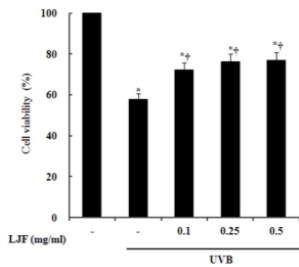


Fig. 2. The effects of LJF extracts on the UVB-induced cytotoxicity in human keratinocyte HaCaT cells. HaCaT cells were pre-treated with or without LJF (0.1, 0.25, or 0.5 mg/ml) for 1h, then stimulated with UVB (200mJ/cm<sup>2</sup>). After 4 h, the cell viability was measured by MTT assay. The results were similar in 3 additional experiments. \**p* < 0.05 significant as compared to untreated normal, †*p* < 0.05 : significant as compared to UVB alone.

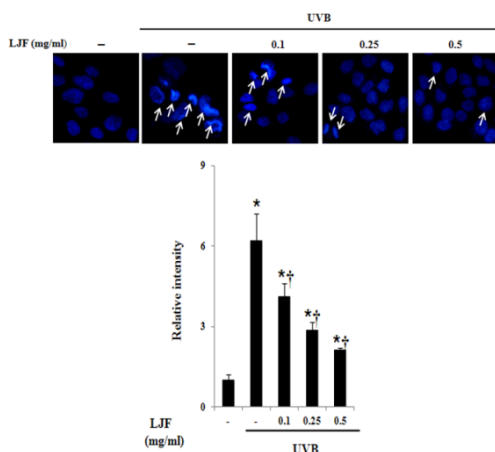


Fig. 3. The effects of LJF on the UVB-induced cell death in human keratinocyte HaCaT cells. The cells were pre-treated with or without LJF (0.1, 0.25, or 0.5 mg/ml) for 1h, and then stimulated with or without UVB (200mJ/cm<sup>2</sup>). After 4h, the cells were harvested for detection of DAPI. To find our the DNA fragment, the cells were stained with DAPI. The condensed DNA was indicated with arrow. The relative condensed intensity per field was calculated by Olympus software. The results were similar in 3 additional experiments. \**p* < 0.05 significant as compared to untreated normal, †*p* < 0.05 : significant as compared to UVB alone.

#### 4. 금은화 물 추출물이 사람 각질형성 세포에서 UVB로 유도된 DNA 분절 및 ROS 생성에 미치는 영향

UVB 조사 후 나타나는 세포 DNA 분절에 금은화 물추출물이 주는 영향을 알아보기 위하여, 금은화 물추출물을 농도 별로 (0.1, 0.25, 0.5 mg/ml)을 UVB 조사 1시간 전에 전처리 하고, 1시간 후 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup>을 조사 후 인큐베이터에서 4시간 배양하였다. 그 결과 정상군에 비하여 대조군인 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 자극군에서 Brad U positive흡광도가 증가하여, DNA분절이 일어나는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 금은화 물추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml 을 처리 하였을 때 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 자극으로 인한 DNA 분절을 유의하게 감소시킬 수 있었다(Fig. 4). 금은화 물추출물이 ROS의 생성에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위하여, 금은화 물추출물을 농도 별(0.1, 0.25, 0.5 mg/ml)로 1시간 전에 전처리 하고, UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup>을 조사 하였다. UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 조사 1시간 후 세포에 DCF-DA를 염색하여, ROS의 생성을 관찰하였다. 그 결과 정상군 보다 UVB 200 mJ/cm<sup>2</sup> 조사군에서 DCFDA의 발현이 증가하였고, 이는 ROS 생성이 크게 증가함을 보여준다. 하지만 금은화 물추출물을 처리 하였을 때 UVB 조사로 인한 ROS 생성이 농도 의존적으로 유의하게 억제됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

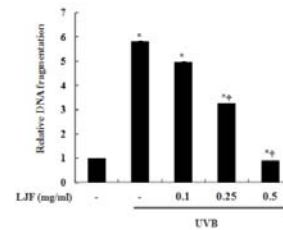


Fig. 4. The effects of LJF on the UVB-induced DNA fragmentation in human keratinocyte HaCaT cells. The cells were pre-treated with or without LJF (0.1, 0.25, or 0.5 mg/ml) for 1h, and then stimulated with or without UVB (200mJ/cm<sup>2</sup>). After 4h, the cells were harvested for detection of DNA fragmentation. The cells were visualized by DNA fragmentation assay. The results were normalized by control absorbance to 1. The results were similar in 3 additional experiments. \**p* < 0.05 significant as compared to untreated normal, †*p* < 0.05 : significant as compared to UVB alone.

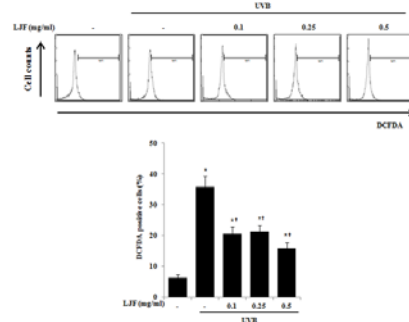


Fig. 5. The effects of LJF on the UVB-induced ROS production in human keratinocyte HaCaT cells. The cells were pre-treated with or without LJF (0.1, 0.25, or 0.5 mg/ml) for 1h, and then stimulated with or without UVB (200mJ/cm<sup>2</sup>). After 1h, the cells were harvested for detection of ROS. Then the ROS production were measured by flourescence microscopy and relative DCFDA intensity. The percentage of shifted area was indicated by graph below. The results were similar in 3 additional experiments. \**p* < 0.05 significant as compared to untreated normal, †*p* < 0.05 : significant as compared to UVB alone.

## 6. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 이용한 금은화 물 추출물과 chlorogenic acid의 성분 분석 연구

금은화 물 추출물의 유효 활성 성분을 알아보고자 HPLC 성분 패턴 분석을 진행 하였다. 먼저, 금은화 물 추출물의 HPLC 성분 패턴을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Fig 6A). 다음으로 금은화의 주요 성분으로 알려져 있는 chlorogenic acid를 이용하여 금은화 물 추출물과 같은 조건에서 패턴 분석을 진행 하였다(Fig 6B). 그 결과 chlorogenic acid는 28.35분에서 피크가 나타났다. 따라서 금은화 물 추출물의 28.35분에 나타나는 피크가 chlorogenic acid임을 추측할 수 있었고, 이러한 결과를 바탕으로 실험에 사용된 금은화 물 추출물의 주요 성분 중의 하나로 chlorogenic acid가 포함되어 있었음을 확인 할 수 있었다.

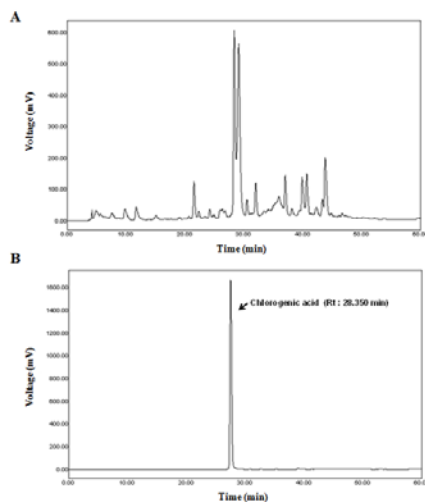


Fig.6. HPLC chromatogram of LjF extract (A) and chlorogenic acid (B).

## 고찰

의학의 발달로 평균 수명이 연장되고 고령화 시대가 초래됨에 따라 웰빙, 안티에이징, 웰에이징 등의 키워드가 부각되면서 스파와 헬스 케어 등과 같은 뷰티산업에 대한 관심이 집중 되고 있다. 특히 탄력적이고 건강한 피부를 유지하고자 하는 소비자층의 증가로 노화방지를 위한 항산화, 항노화 관련 기능성 화장품에 대한 연구가 활발히 진행 중이다<sup>23</sup>. 피부는 인체의 최외각에 존재함으로써 자외선에 직접적으로 노출되기 쉬우며, 노출된 피부는 지속적으로 영향을 받게 되면, 활성산소종에 의한 광산화적 노화가 발생 된다<sup>24</sup>. 자외선 중 피부 손상의 주된 원인은 280 - 380 nm의 중파장을 갖고 있는 UVB이다. UVB는 진피의 상층부까지 도달하여 피부 내 ROS의 생성을 촉진시켜 세포에 돌연변이를 유발하고 aspartate나 glutamate와 같은 흥분성 아미노산의 분비를 촉진 시켜 단백질 기능에 손상을 유도한다<sup>25-27</sup>. 또한 nitric oxide(NO)와의 상호 작용에 의한 peroxynitrate의 독성물질 생성<sup>28,29</sup>, 세포 내 칼슘의 과잉 축적되어 세포 손상을 유도 한다<sup>25,30</sup>. 특히 표피에 존재

하는 각질형성세포(keratinocyte)와 색소세포(melanocyte), 면역세포(langerhans cell)에 직접적인 영향을 미침으로서 세포의 기능적, 피부의 구조적 문제를 야기 시키게 된다. 그로 인해 피부에 비정상적인 각화 주기로 인한 각질의 들뜸이나 예민함, 색소침착, 피부 염증 등이 발생하게 된다. 이렇듯 건강한 피부는 다양한 ROS에 대하여 세포 보호 작용을 나타내지만 활성 산소가 과하게 발생되거나 지속적인 산화상태에서 회복되지 못하게 되면 산화적 손상에 대한 방어체계의 불균형으로 인해 활성산소종 유래의 다양한 질환을 유발 시킨다<sup>31,32</sup>. 따라서 활성산소종은 피부세포 및 조직의 손상과 항산화 방어체계의 균형을 파괴시키며, 지질과산화, 단백질 산화, 콜라겐과 엘라스틴 등의 결합 섬유 사슬 절단 및 멜라닌 생성 반응의 촉진 DNA손상으로 인한 핵 분절 등과 같은 각종 효소와 단백질의 비정상적 활성화를 야기 시킴으로써 피부 노화를 가속화 시킨다<sup>33,34</sup>. 이에 본 연구에서는 선행연구에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 손상에 대한 금은화 물 추출물의 세포보호 효과를 확인 하였<sup>22</sup>, 그 결과를 바탕으로 UVB로 인한 피부 각질 형성 세포 손상을 금은화가 ROS를 억제함으로써, 산화적 손상에 대한 세포 사멸을 억제 할 수 있는지에 대하여 접근 하였다.

최근 연구에서는 광노화를 지연시키고 억제하기 위해서 자외선에 의해 발생하는 활성산소종을 억제하여 젊고 건강한 피부를 유지하고자 하는 목적에 따라 항노화, 항산화 기능성 원료 및 화장품에 대한 연구가 활발히 진행 중이다<sup>23</sup>. 따라서, 금은화 물 추출물의 항산화능력을 평가하기 위하여 성분분석, 항산화력 측정에 미치는 영향에 대해서 분석해 보았다. 그 결과, 금은화 물추출물에 총 페놀 함량이 우수하게 포함되어 있으며, 총 플라보노이드 함량도 금은화 물 추출물의 농도가 증가함에 따라 비례적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 UVB로 유도한 세포 손상에 대한 세포 보호효과에 대해서 알아보하고자 하였다. 각질형성세포에 UVB를 (50, 100, 200, 300 mJ/cm<sup>2</sup>) 선량별로 조사 한 결과 각질형성세포 HaCaT에서 UVB로 유도된 산화적 스트레스에 따른 ROS를 과생성하고 있음을 알 수 있었다. 이에 금은화 추출물(0.1, 0.25, 0.5 mg/ml) 농도별로 전 처리한 후, UVB 200mJ/cm<sup>2</sup>의 과도한 산화적 스트레스를 유도하였을 때, ROS의 과생성이 억제되고, 세포 사멸 및 손상을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다. UVB에 의한 세포 사멸은 세포가 위축되면서 사멸체(apoptotic body)라는 포낭을 형성한다. 세포 사이에 틈새가 생기고, 핵 응축(chromatin)이 일어나 세포 내 DNA가 규칙적으로 절단되면서 인접해 있는 세포의 식작용에 의해 먹혀버림으로서 죽음에 이르게 된다<sup>35-39</sup>. 그러므로 자극 후 세포 내 핵 응축 진행 정도를 관찰하고, 세포 내 DNA 분절을 측정하는 것은 세포 사멸 분석에서 중요한 지표가 된다. 본 연구에서는 HaCaT 세포에 UVB를 조사하여 자극에 따른 세포 손상 정도를 핵 염색을 통해 그 형태와 응축 정도를 파악하고, 세포의 DNA를 추출하여 DNA 분절 정도를 살펴보았다. 그 결과 HaCaT 세포에 UVB 조사 시 증가하던 핵 응축과 DNA 분절 현상이 금은화 추출물을 전 처리 하였을 때, 농도 의존적으로 감소시킴을 확인 하였다.

이러한 결과를 바탕으로, 금은화 물 추출물이 함유하고 있는 주요 유효 성분이 무엇인지 알아보고자 HPLC를 이용하여 지표 성분 분석을 수행 하였다. 이에, 금은화의 주 성분으로

알려진 Loganin, Lupeol, chlorogenic acid 등을 같은 조건에서 분석해 보았다. 그 중에서, Fig. 6과 같이 chlorogenic acid만이 본 실험에 사용된금은화 물 추출물에서 확인되었다. Chlorogenic acid는 폴리페놀 화합물의 일종이며, 커피콩 특유의 착색 원인 물질로 감자, 고구마의 껍질에도 많이 함유되어 있다. 생체 내에서 과산화 지질의 생성 억제효과, 콜레스테롤 생합성 억제 및 항산화와 함암 작용을 한다고 알려져 있다<sup>38,39</sup>. 본 연구에서는금은화 물 추출물에서 나오는 피크와 chlorogenic acid의 HPLC 피크의 retention time이 28.35분에서 동일하게 나타났고, 이는금은화 물 추출물은 chlorogenic acid를 주요한 성분 중의 하나로 함유하고 있는 것을 나타낸다. 또한, Cha et al<sup>40</sup>의 chlorogenic acid가 UVB에 의한 HacaT손상을 억제한다는 연구를 참고해보면,금은화의 주요성분 중에 하나인 chlorogenic acid가금은화 물 추출물의 보호작용에 부분적으로는 기여하지 않았을 가 추측해 볼 수 있다. 본 연구 결과에서금은화 물추출물은 UVB로 유도된 산화적 손상으로부터 농도 의존적으로 세포를 보호하였고, ROS를 억제하고 DNA 분절을 억제함으로써 세포 보호효과가 있음을 제시 하였다. 하지만 이 연구는 본 저자의 논문을 부분 인용한 것으로<sup>41</sup>, 추가적으로 HaCaT 세포에서금은화 추출물이 보호효과를 갖는 세부 기전에 관한 연구가 이루어진다면,금은화 물 추출물이 자외선에 의한 피부 질환 개선 제품을 개발하는데 유용한 소재로 이용될 수 있을 것으로 사료 된다.

## 결론

본 연구에서는금은화 물 추출물을 이용하여 사람각질형성세포인 HaCaT keratinocyte에서 UVB로 유도된 산화적인 손상에 대한 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 금은화 물 추출물의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정결과 우수한 것을 확인하였다.
2. 금은화 물 추출물의 총 항산화능 및 superoxide 소거 활성 효과가 우수한 것을 확인하였다.
3. 금은화 물 추출물은 HaCaT keratinocyte에서 UVB (200 mJ/cm<sup>2</sup>) 유도된 산화적 손상에 대해 농도 의존적으로 세포 생존률을 증가 시켰다.
4. 금은화 물 추출물은 HaCaT keratinocyte에서 UVB로 유도된 DNA chromatin의 응축 및 DNA 분절을 감소 시켰다.
5. 금은화 물 추출물은 HaCaT keratinocyte에서 UVB로 유도된 ROS의 생성을 농도 의존적으로 억제 하였다.
6. 금은화 물 추출물의 주요 성분을 HPLC로 분석한 결과 chlorogenic acid가 주요 함유 성분으로 나타났다.

이상의 결과, 금은화 물 추출물은 사람각질형성세포인

HaCaT keratinocyte에서 UVB로 유도된 산화적인 스트레스에서 세포 보호 및 ROS 생성 억제 및 DNA 분절 억제 효과가 우수하게 작용하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과를 바탕으로 금은화 물 추출물이 피부의 광산화적 손상을 개선하는데 주요하게 작용함으로써 항산화, 항노화의 기능성 화장품으로의 활용 가능성을 시사한다. 추후에금은화 물 추출물의 세포보호 효과를 나타내는 주요 성분연구 및 chlorogenic acid에 대한 세부적인 후속연구, 피부에서 산화적인 손상을 억제하는 구체적인 기전 연구와 *in vivo* 동물 실험을 통한 임상적용의 기초연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

## References

1. Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic ions in human diseases. Mol Aspects Med. 1985 ; 8(2) : 89-193.
2. Park SN. Antioxidative Properties of Baicalein, Component from Scutellaria baicalensis Georgi and Its Application to Cosmetics (I). J Korean Ind Eng Chem. 2003 ; 14(5) : 657-65.
3. Park KJ, Park SH, Kim JK. Anti-wrinkle Activity of Acanthopanax senticosus Extract in Ultraviolet B (UVB)-induced Photoaging. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2010 ; 39(1) : 42-6.
4. Azizi E, Lusky A, Kushelevsky AP, Schewach MM. Skin type, hair color, and freckles are predictors of decreased minimal erythema ultraviolet reirradiation does. J Am Acad Dermatol. 1988 ; 19(1 pt 1) : 32-8.
5. Applegate LA, Noel A, Vile G, Frenk E, Tyrrell RM. Two genes contribute to different extents to the heme oxygenase enzyme activity measured in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: implications for protection against oxidant stress. Photochem Photobiol. 1995 ; 61(3) : 285-91.
6. Jo HR, Lee HJ, Kang MH. Antioxidative Status, DNA Damage and Lipid Profiles in Korean Young Adults by Glutathione S-Transferase Polymorphisms. J Nutr Health. 2011 ; 44(1) : 16-28.
7. Lee EH, Lee JK, Hong JT, Jung KM, Kim YK, Lee SH, Chung SY, Lee YW. Protective effect of green tea extract, cat-echin on UVB-induced skin damage. J Food Hygiene Saf. 2001 ; 16(2) : 117-24.
8. Kim JS, Kim JB. The Effects of Extracts from Mulberry (Morus alba) Leaves and Branches on UVB-induced Skin Damage. J Kor Soc Cosm. 2011 ; 17(6) : 993-9.
9. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human

- health. *Pharmacogn Rev.* 2010 ; 4(8) : 118–26.
10. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009 ; 7(1) : 65–74.
  11. Cho WJ, Yoon HS, Kim YH, Kim JM, Yoo IJ, Han MD, Bang IS. Cytoprotective Effects and Gene Expression Patterns Observed Based on the Antioxidant Activity of *Lonicera japonica* Extract. *J life sci.* 2013 ; 23(8) : 989–97.
  12. Dan Bensky, Andrew Gamble. Chinese herbal medicins. *Materia Media, WA : Eastland Press.* 1986 : 85–6.
  13. Huang KC. *The Pharmacology of Chinese herbs (2nd Ed.)*. FL : CRC, 1998 : 8–9.
  14. Bae JH, Kim MS, Kang EH. Antimicrobial Effect of *Lonicerae* Flos Extracts on Food-borne Pathogens. *Food Sci Biotechnol.* 2005 ; 37(4) : 642–7.
  15. Joo JS, Kim JS, Jeong JG, Kim BK. Study of efficacy of *Foeniculi fructus* and *Lonicerae flos* extract on acute pancreatitis. *Kor J Herbology.* 2010 ; 25(4) : 39–45.
  16. Ohata S, Sato N, Tu SH, Shinoda M. Protective effects of Taiwan crude drugs on experimental liver injuries. *Yakugaku Zasshi.* 1993 ; 113(12) : 870–80.
  17. Rim BM, Rim CW, Choi JY, Chung YS, Jeong HG. Effects of *Lonicera japonica* extract as a biological response modifier. *Environ Mut Car.* 1992 ; 12(1) : 45–54.
  18. Luo ZH. The combined modulating effects of cerium nitrate with certain Chinese traditional drugs on altered cell-mediated immunities in scald mice. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 1990 ; 28(9) : 562–5, 574–5.
  19. Kim Y, Yang SY, Oh YS, Lee JW, Lee YK, Park YC. Research trends of *Lonicera japonica* over the last 10 year. *J Daejeon Orient Med.* 2011 ; 19(1) : 17–23.
  20. Han ZZ, Zhang HS, Kang SC, Gil KH, Kong KH, Kim DH, Ahn TH, Bae JS, Go HK, Han MG. A 90-day repeated-dose oral toxicity study on Flos *Lonicerae* extract in Fischer 344/N rats. *Korean J Vet Res.* 2008 ; 48(4) : 401–11.
  21. Park JY, Back YD, Kim MR, Roh SS. The study on chemical components and korean medical effect of *Lonicera japonica*. *J Jeahan Orient Med Acad.* 2013 ; 11(1) : 1–14.
  22. Seo SH, Choi MO. Protective effects of *Lonicerae Japonicae* Flos against hydrogen peroxidase-induced oxidative stress on Human keratinocyte, HaCaT cells. *Kor J Herbology.* 2013 ; 28(4) : 57–62.
  23. Lee DS, Lim MS, Kwon SS, Kim SY, Park SN. Antioxidative Activity and Componential Analysis of *Chamaecyparis obtusa* Leaf Extract. *Appl Chem Eng.* 2012 ; 23(1) : 93–9.
  24. Jo NR, Park CI, Park CW, Shin DH, Hwang YC, Kim YH, Park SN. Cellular Protective Effects of Peanut Sprout Root Extracts. *Appl Chem Eng.* 2012 ; 23(2) : 183–9.
  25. Oh YL, Choi YS. Effect of *Oenothera lamarckiana* Extract Belong in *Oenotheraceae* on Antioxidant Activity and Melanogenesis. *J Korean Soc People Plant Environ.* 2011 ; 14(1) : 9–15.
  26. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci.* 1990 ; 10(3) : 1035–41.
  27. Beehler BC, Przybyszewski J, Box HB, Kulesz-Martin MF. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Carcinogenesis.* 1992 ; 13(11) : 2003–7.
  28. Dawson DA, Kusumoto K, Graham DI, McCulloch J, Macrae IM. Inhibition of nitric oxide synthesis does not reduce infarct volume in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neurosci Lett.* 1992 ; 142(2) : 151–4.
  29. Lee C, Park GH, Ahn EM, Park CI, Jang JH. *Sargassum fulvellum* Protects HaCaT Cells and BALB/c Mice from UVB-Induced Proinflammatory Responses. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013 ; 2013 : 747846.
  30. Leonard S, Wang S, Zang L, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. Role of molecular oxygen in the generation of hydroxyl and superoxide anion radicals during enzymatic Cr(VI) reduction and its implication to Cr(VI)-induced carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2000 ; 19(1–2) : 49–60.
  31. Seo JY, Choi HR, Rhie GE, Youn CS, Choi WW, Kim JA, Chung JH, Cho KH, Eun HC. The effect of retioic acid and vitamin C on the expression of the procollagen (I), tropoelastin, and MMP-1 in human dermal fibroblast. *Kor J Invest Dermatol.* 2001 ; 8 : 23–8.
  32. Yaar M, Gilchrist BA. Photoageing; mechamism, pre-vention and therapy. *Br J Dermatol.* 2007 ; 157(5) : 874–87.
  33. Jiang SJ, Chu AW, Lu ZF, Pan MH, Che DF, Zhou XJ. Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient. *Exp Dermatol.* 2007 ; 16(12) : 985–92.
  34. Jeon HY, Kim JK, Seo DB, Lee SJ. Effects of Chlorophyll a on UVB-induced Cellular Responses and Type I pN Collagen Synthesis in vitro. *Food Sci Biotechnol.* 2009 ; 41(6) : 700–5



35. Wang H, Cho CH. Effect of NF- $\kappa$ B signaling on apoptosis in chronic inflammation-associated carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010 ; 10(6) : 593-9.
36. Aluyen JK, Ton QN, Tran T, Yang AE, Gottlieb HB, Bellanger RA. Resveratrol: potential as anticancer agent. *J Diet Suppl*. 2012 ; 9(1) : 45-56.
37. Zeng H, Kong X, Peng H, Chen Y, Cai S, Luo H, Chen P. Apoptosis and Bcl-2 family proteins, taken to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012 ; 16(6) : 711-27.
38. Frank J, Kamal-Eldin A, Razdan a, Lundh T, Vessby B. The dietary hydroxycinnamate caffeic acid and its conjugate chlorogenic acid increase vitamin e and cholesterol concentrations in Sprague-Dawley rat. *J Afric Food chem*. 2003 ; 51(9) : 2526-31.
39. Park SH, Han SB, Kim YS. Physiological Activity of Polyphenol and Chlorogenic Acid. *J Biomed Res*. 2011 ; 12(2) : 61-9.
40. Cha JW, Piao MJ, Kim KC, Yao CW, Zheng J, Kim SM, Hyun CL, Ahn YS, Hyun JW. The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014 ; 22(2) : 136-42.
41. Seo SH. The Protective effect of *Lonicera japonica* Flos extracts on UVB or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced human keratinocyte. Kwangju women university, 2014.