

Original Article / 원저

복분자의 항산화 및 광독성 억제활성에 미치는 영향

이인수¹ · 김용민² · 김희택¹

¹ 세명대학교 한의과대학 안이비인후과학교실

² 세명대학교 한방화장품과학과

The Effects of Anti-Oxidant and Phototoxic Inhibitory Activity of *Rubus coreanus* Fruits

In-Su Lee¹ · Yong-Min Kim² · Hee-Taek Kim¹

¹ Dept. of Oriental Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Korean medicine, Semyung University

² Dept. of Oriental Medical and Herbal Cosmetic Sciences, Semyung University

Abstract

Objectives : Oxidation by active oxygen in the body, phototoxicity and photoallergic interest has grown, antioxidant and phototoxicity inhibiting substances for research progress. The purpose of this study was to examine the effects on antioxidant and phototoxicity of *Rubus coreanus* Fruits.

Material and Methods : Hs68 cell lines using the DPPH radical scavenging activity, cytotoxic, phototoxic inhibitory activity and apoptosis were measured.

- Results** : 1. In MIT assay, the concentrations of *Rubus coreanus* Fruits that were used on the test had no cytotoxicity.
2. In DPPH radical scavenging activity, the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ anti-oxidant effect of *Rubus coreanus* Fruits was statistically significant increased than control group in dose-dependantly.
3. In phototoxic inhibitory activity, *Rubus coreanus* Fruits dose-dependantly increased the cell viability of Hs68 cell lines.
4. The concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ *Rubus coreanus* Fruits inhibited the enrichment of nucleus in the Hs68 cell stimulated with UVB.

© 2015 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions : These results indicate that *Rubus coreanus* Fruits has anti-oxidant effects and Phototoxic Inhibitory Activity. If further study is performed, the use of *Rubus coreanus* Fruits will be valuable and beneficial in the therapy of skin aging and damage.

Key words : *Rubus coreanus* Fruits; UVB; DPPH; phototoxicity; ROS

I. 서 론

최근 첨단 과학과 의료기술의 발전으로 인간의 수명이 연장되면서 사회는 점점 고령화 사회로 진입하게 되었으며 이에 따라 각종 만성 질환의 발병률이 증가하고 있고 이러한 만성질환의 원인이 생체에서 발생하는 hydroxyl radical, superoxide radical, 과산화수소 등과 같은 활성산소류(reactive oxygen species, ROS)에 의한다고 알려졌다¹⁾. 생체 내에서 활성산소가 과도하게 발생되고 균형이 깨지는 경우 세포나 조직이 손상 받게 되고 이는 지질과산화, 단백질변성, 세포막과괴, DNA 손상 등에 영향을 미쳐 암, 심장병, 동맥경화증, 백내장 등 여러 퇴행성 질환이 발생되며²⁾, 이에 최근 활성산소를 제거하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

활성산소와 관련된 인체 질환에 대한 항산화 효능이 관심을 가지면서 현재 butylated hydroxy anisole(BHA), butyl hydroxy toluen(BHT) 등 합성 항산화제 등이 개발되어 활용되나 동물실험에서 발암성이 보고되어 안전성 문제점이 지적되고 있다³⁾. 이러한 이유로 합성 항산화제 사용이 제한되면서 합성 항산화제보다 효과가 우수하거나 비슷한 천연 항산화제 개발이 요구되어지고 있으며, 우리가 흔히 접할 수 있는 각종 식품 및 한약재에 대한 항산화 효능 연구가 활발히 진행되고 있는 상황이다^{4,5)}.

피부에 지속적인 자외선의 노출은 피부의 구조와 기능에 부정적인 영향을 주어 피부의 급격한 노화뿐

만 아니라 홍반, 부종, 화상⁶⁾, 편평 및 기저세포암, 악성 흑색종, 화학선에 의한 탄력섬유증과 각화증⁷⁾ 등의 질병을 일으킨다⁸⁾. 이러한 변화를 유발시키는 주요 원인 물질은 자외선으로 유발된 활성산소로 섬유아세포의 세포질 신호 전달을 교란시켜 세포 기질이 파괴되고 콜라겐 생성이 감소하여 광노화가 발생한다⁹⁾. 자외선으로 유발되는 활성산소를 효과적으로 제거하기 위해 피부에 항산화제를 도포하거나 항산화능을 가지고 있는 식품이나 한방 소재 약물의 규칙적인 섭취가 유용한 방법으로 제시되고 있다¹⁰⁾.

복분자는 益腎, 固精, 縮尿의 효능으로 腎虛遺尿, 小便頻數, 陽痿早泄, 遺精滑精 등의 치료에 사용되고 있으며¹¹⁾, 항산화능^{12,13)}, 항염작용^{14,15)}, 항골다공증¹⁶⁾, 항류마티즘¹⁷⁾ 및 항아나필락시스 효과¹⁸⁾ 등 여러 가지 질환에 대한 효능이 보고되고 있다. 이에 저자는 사람의 foreskin에서 유래한 Hs68 세포에 자외선을 조사하여 인위적으로 광독성을 유발시킨 후 복분자 추출물의 광독성 억제 효과를 평가하였다.

II. 실험 방법

1. 실험 재료

1) 시료 준비

복분자는 (주)HMAX(제천, 한국)에서 구입하였다. 복분자 1 kg을 분쇄하여 메탄올(5 L)에 넣고 상온에서 overhead stirrer를 이용하여 3일 동안 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 추출물을 Whatman No.1 여과지로 여과 및 감압농축기를 이용하여 농축하고 vacuum oven에서 2일간 용매를 완전히 제거하

Corresponding Author : Hee-Taek Kim,
Semyung University Oriental Medicine Hospital, 66,
Semyeong-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea
(Tel:043-649-1817, E-mail:kht8725c@naver.com)

• Recieved 2015/1/5 • Revised 2015/1/28 • Accepted 2015/2/4

여 복분자 메탄올 추출물(RME) 85.36 g(8.54%)을 얻었다. 이 추출물은 사용하기 전까지 냉장 보관하였다.

2) 세포 배양

사람의 foreskin에서 유래한 Hs68 세포를 10%의 Fetal bovine serum (FBS;GIBCO)과 10,000 units/ml penicillin 과 10,000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO)에서 37°C 5% CO₂의 조건에서 배양하였다.

2. 실험방법

1) 세포 독성

Hs68 세포를 샘플 처리 전 1×10^5 cells/well의 농도로 96 well plate에 24시간 동안 배양하였다. 24시간 뒤 배지를 제거하고 L-glutamate가 결핍된 DMEM에서 다시 24시간 동안 배양 시켰다. 샘플을 각각 100, 50, 10, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양한 뒤 MTT를 10 μl 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 200 μl 의 DMSO 넣고 충분히 vortex 한 뒤 이를 ELISA reader를 이용하여 wave length 570 nm에서 측정하였다.

2) DPPH radical 소거능

Free radical의 소거능을 확인하기 위해 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma Aldrich) 소거능 측정을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. 96 well plate 에 샘플을 각각 100, 50, 10, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석하여 80 μl 씩 준비 시키고 (A) 0.15 mM DPPH/MeOH 를 80 μl 에 첨가한 뒤 실온에서 10분간 반응시켰다. 샘플자체의 색이 반영되는 것을 배제하기 위하여 각각의 농도의 샘플만의 흡광도 (샘플 80 μl + MeOH 80 μl) 를 측정하였고 (B), 대조군으로 샘플의 용매와 150 mM DPPH를 반응 시킨 것을 이용 하였다 (C). 이를 ELISA reader를 이용하여 wave length 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화능은 다음과 같은 방법으로 평가하였다.

$$\text{Inhibition} = [1 - (A - B) / C] \times 100$$

3) UVB 광조사

UVB 램프(312nm; Viber Lourmat)를 광원으로 사용하였다. 자외선 조사 전 6 well plate에 Hs68 세포주를 1×10^5 cells/well의 조건으로 배양하였으며 24시간 뒤 16시간 동안 serum starvation을 시켰다. 1 ml의 phosphate buffered saline(PBS)로 2번 washing 한 뒤 1 ml의 PBS에서 UVB 조사를 하였다(80 mJ/cm²). 조사 뒤 즉시 배지를 갈아주고 24시간 각각의 샘플의 농도 (100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/ml}$)에서 배양하였다. 대조군은 UVB 조사 없이 같은 방법으로 PBS washing과 배지교환을 해주었다.

24시간 뒤 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma Aldrich) 를 200 μl 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 1 ml의 DMSO 넣고 이를 ELISA reader를 이용하여 wave length 570 nm에서 측정하였다.

4) Hoechst 염색

Apoptosis 가 진행되는 세포를 관찰하기 위하여 Hoechst 염색을 실시하여 apoptosis가 진행되고 있는 세포의 핵을 관찰하였다. 상기와 같은 방법으로 Hs68 세포를 6 well plate 에서 UVB 조사시킨 후 즉시 배지를 갈아 주고 배양 시켰다. 4시간 뒤 배지를 제거하고 4%의 paraformaldehyde (PFA; Sigma Aldrich) / PBS 에서 on ice에서 1시간 동안 고정시켰다. 고정 뒤 1ml PBS에서 3번 washing 해주고 1ml PBS에서 Hoechst 33258 (Invitrogen) 을 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 10분간 배양하고, 형광현미경 EVOS fluorescence microscopy에서 관찰 하였다.

5) 통계 분석

각 실험군간 통계적 유의성을 분석하기 위하여

Student t-test 를 사용하였다. 모든 결과는 각 실험군의 평균값 \pm 표준편차 (Mean \pm SD)로 나타내었고, 유의확률(p-value)은 $p < 0.05$ 로 하였다.

III. 실험 성적

1. 세포 독성

복분자 메탄올 추출물의 독성을 알아보기 위해 사람의 foreskin에서 유래한 Hs68 세포에 각각 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 MTT assay를 시행하였다. Control(0 $\mu\text{g/ml}$)에서의 생존율을 100%로 하였을 때 모든 농도에서 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 1).

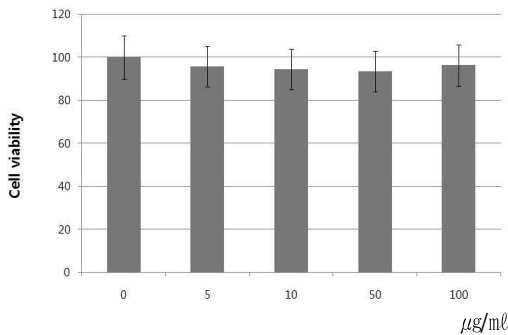


Fig. 1. The effect of *Rubus coreanus* Fruits on cell viability.

0 : Control group
 5 : 5 $\mu\text{g/ml}$ *Rubus coreanus* Fruits treated group
 10 : 10 $\mu\text{g/ml}$ *Rubus coreanus* Fruits treated group
 50 : 50 $\mu\text{g/ml}$ *Rubus coreanus* Fruits treated group
 100 : 100 $\mu\text{g/ml}$ *Rubus coreanus* Fruits treated group
 Results represent as the mean \pm SD.

2. DPPH radical 소거능 측정

DPPH의 환원성을 이용하여 복분자의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $14.12 \pm 5.64\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $32.17 \pm 4.95\%$ 로 소거 효과가 높지 않았으나 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는

$94.9 \pm 0.68\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $95.93 \pm 0.81\%$ 로 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서 농도 의존적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 높은 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

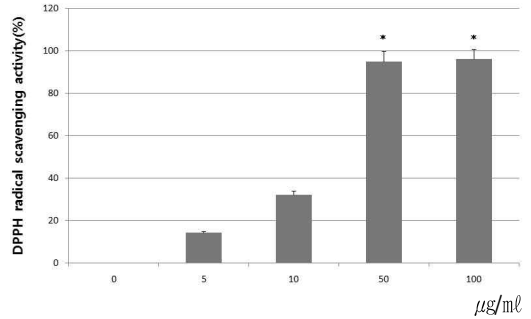


Fig. 2. Effects of *Rubus coreanus* Fruits on DPPH Radical Scavenging Activity.

0 : Control group
 5 : 5 $\mu\text{g/ml}$ *Rubus coreanus* Fruits treated group
 10 : 10 $\mu\text{g/ml}$ *Rubus coreanus* Fruits treated group
 50 : 50 $\mu\text{g/ml}$ *Rubus coreanus* Fruits treated group
 100 : 100 $\mu\text{g/ml}$ *Rubus coreanus* Fruits treated group
 Results represent as the mean \pm SD.
 * $p < 0.05$: significant as compared to control group.

3. 광독성 억제 활성 측정

복분자의 광독성 억제 활성을 알아보기 위해 Hs68 세포주에 UVB 램프 (312nm; Viber Lourmat)를 광원으로 사용하여 자외선을 조사하였다. 대조군은 UVB를 조사하지 않았고 시험군은 UVB 조사 후 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 배양하여 Hs68 세포주의 생존 능력을 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 모든 시험군에서 농도 의존적으로 유의하게 ($p < 0.05$) cell viability가 증가하였다(Fig. 3).

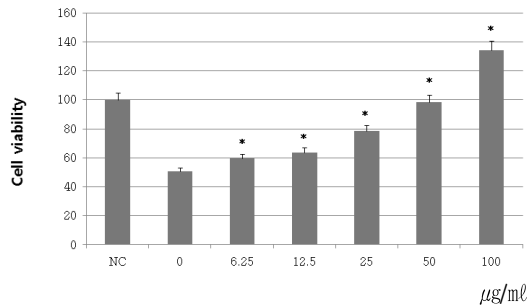


Fig. 3. The Effects of phototoxic inhibitory activity of *Rubus coreanus* Fruits.

NC : Normal control
 0 : 0 µg/ml *Rubus coreanus* Fruits treated group
 6.25 : 6.25 µg/ml *Rubus coreanus* Fruits treated group
 12.5 : 12.5 µg/ml *Rubus coreanus* Fruits treated group
 25 : 25 µg/ml *Rubus coreanus* Fruits treated group
 50 : 50 µg/ml *Rubus coreanus* Fruits treated group
 100 : 100 µg/ml *Rubus coreanus* Fruits treated group
 Results represent as the mean±SD.
 *p(0.05 : significant as compared to control group.

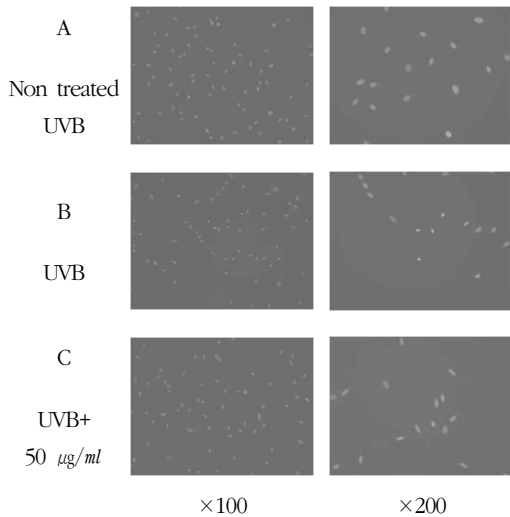


Fig. 4. Representative fluorescent images of not treated UVB controls and UVB-irradiated cell nucleus in Hs68 were measured using a fluorescence microscopy.

A : Representative fluorescent images of not treated UVB controls
 B : Representative fluorescent images of UVB irradiation
 C : Representative fluorescent images of treated 50 µg/ml *Rubus coreanus* Fruits after UVB irradiation

4. Apoptosis 측정

UVB 조사로 apoptosis가 진행되는 세포를 관찰하기 위하여 Hoechst 염색을 실시하고 형광현미경을 이용하여 apoptosis가 진행되고 있는 Hs68 세포의 핵을 관찰하였다. 그 결과 UVB를 조사하고 50 µg/ml 농도로 처리한 복분자에서 UVB를 조사한 대조군에 비해 세포핵의 농축을 억제하였다(Fig. 4).

IV. 고찰

피부 노화는 피부의 구조와 생리적 기능이 나이를 먹으면서 쇠퇴하는 내인적 노화(intrinsic aging)와 태양광선 등 누적된 외부 스트레스와 내인적 노화현상이 함께 진행되는 외인적 노화(extrinsic aging) 두 종류로 나눌 수 있다¹⁹. 그 중에서도 태양광선은 잘 알려진 노화 원인들 중의 하나로 UVA, UVB가 일으키는 피부 노화를 광노화(photoaging)라고도 부른다²⁰. 자외선은 파장에 따라 UVA(320-400nm), UVB(290-320nm), UVC(200-290nm)로 나뉘어지며, 이 중 UVB가 피부 손상에 가장 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있다²¹.

자외선에 의한 피부손상은 일광화상에서부터 광노화와 발암 현상에 이르기까지 노출의 정도와 기간, 피부의 상태에 따라 다양한 과정으로 나타나며²², 이로 인한 피부는 깊고 굵은 주름, 피부 처짐, 혈관확장, 탄력 감소, 수포 생성 및 자외선이 노출된 부위에 불규칙한 색소 침착이 발생한다²³.

피부 내로 흡수된 빛은 핵산, 아미노산 그리고 멜라닌 등 다양한 색소체들에게 빛에너지를 전달하게 되며, 그 결과 색소체들은 광분해 반응을 일으켜 자유기들(free radicals)을 생성하고 생체 내에 존재하는 유리 산소분자와 상호작용을 하여 superoxide anion radical을 만든다^{24,25}. 이들은 여러 반응 경로를 거쳐 피부 표면의 keratinocyte에서 뿐만 아니라 진피조직의 fibroblast에서 superoxide anion, peroxide,

singlet oxygen 등을 포함하는 유해한 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)을 과잉생성 하게 된다^{26,27}.

이러한 유해한 활성산소종들은 지질 과산화, 단백질 산화, 세포 성분을 파괴하는 단백질 분해 효소들의 활성화, collagen과 elastin의 시슬 절단 및 비정상적인 교차 결합, hyaluronic acid 시슬의 절단, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화 등의 손상을 야기해 세포 유전자 변형, 세포 성장 억제, 세포노화, 세포자멸사 등을 촉진시킨다²⁸⁻³¹. 피부에는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소가 존재하여 유해 활성산소종으로부터 보호작용을 가지게 된다³². 그러나 장기간 자외선, 특히 UVB에 노출되면 피부에 정상적으로 존재하는 항산화효소가 파괴되고 그 결과 산화 스트레스가 증가하여 세포 성분들을 손상시키고 광노화를 촉진시킨다^{33,34}. 그러므로 피부노화 및 각종 만성 피부질환을 예방하기 위해서는 유해 활성산소종을 효과적으로 제거하는 것이 중요하며, 최근에는 천연 항산화제에 대한 관심이 높아지고 있다.

복분자는 장미과(Rosaceae)에 속하는 복분자 딸기의 미숙한 열매를 건조한 것으로 性은 溫하고 味는 甘酸하며 益腎, 固精, 縮尿의 효능으로 腎虛遺尿, 小便頻數, 陽痿早泄, 遺精滑精 등의 치료에 사용되고 있다⁹. 복분자 열매에는 탄수화물, 단백질, 지방 및 식이섬유가 포함되어 있고, 활성성분으로는 tannin을 포함한 여러 플라보노이드류, 그 외에 여러 유기산 및 알콜 및 하이드로카본류가 주류를 이루고 있다. 이러한 활성성분으로 인해 면역활성 증가, 항산화활성 증대, 호르몬분비 촉진, B형 간염바이러스 억제, 체중조절 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다³⁵. 복분자에 함유된 기능성 물질에 대한 연구로는 잎과 줄기로부터 tannin 및 flavonoids 화합물이 보고³⁶⁻³⁸ 되었으며, 항산화능^{12,13}, 항염작용^{14,15}, 항골다공증¹⁶, 항류마티즘¹⁷ 및 항아나필락시스 효과¹⁸가 보고되고 있으나 광독성 억제에 대한 연구는 없었다.

이를 위해 Hs68(Human Foreskin fibroblast line; ATCC, CRL-1635) 세포주를 이용하여 복분자의 세포독성, DPPH radical 소거능, 광독성 억제 활성 및 apoptosis를 측정하였다.

본 연구에서 복분자의 세포독성을 평가하기 위해 사용한 MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소작용에 의하여 수용성 기질인 MTT가 비수용성 기질인 MTT-formazan 결정으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 신속하고 정확하게 많은 양의 세포 증감 거동을 측정할 수 있다. 자주색 결정이 MTT-formazan은 DMSO에 용해되고 흡광도 540 nm에서 최대가 되며, 이 과정에서 측정된 흡광도는 살아 있는 세포수와 직선적인 상관관계를 이룬다³⁹.

실험에 사용된 복분자 메탄올 추출물의 독성을 알아보기 위해 Hs68 세포에 각각 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 MTT assay를 시행한 결과 모든 농도에서 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 1).

Free radical은 홀전자를 갖는 원자단으로 이는 짝을 짓지 않은 활성 전자를 가지고 있기 때문에 불안정하고, 매우 큰 반응성을 갖는다. Free radical의 이러한 큰 반응성으로 신체 장기 등에 손상을 주며 결과적으로 노화를 가속화시킨다. DPPH 실험법은 이러한 free radical의 소거능을 확인하는 대표적인 실험 방법으로 항산화 물질의 항산화능 측정에 많이 이용되고 있다^{40,41}.

복분자의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH의 환원성을 이용하여 복분자의 DPPH radical 소거효과를 측정한 결과 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $14.12 \pm 5.64\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $32.17 \pm 4.95\%$ 로 소거 효과가 높지 않았으나 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $94.9 \pm 0.68\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $95.93 \pm 0.81\%$ 로 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서 농도 의존적으로 유의하게($p < 0.05$) 높은 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

복분자의 광독성 억제 활성을 알아보기 위해 Hs68 세포주에 UVB 램프 (312nm; Viber Lourmat)를 광원

으로 사용하여 자외선을 조사하였다. 대조군은 UVB를 조사하지 않았고 시험군은 UVB 조사 후 0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 배양하여 Hs68 세포주의 생존 능력을 측정된 결과 대조군에 비해 모든 시험군에서 농도 의존적으로 유의하게($p < 0.05$) cell viability가 증가하였다(Fig. 3).

세포자살(apoptosis)은 세포의 괴사나 병적인 죽음에서 보이는 necrosis와는 달리 단기간에 순차적으로 일어난다. Apoptosis는 여러 가지 요인에 의하여 발생하는데, 자외선에 의한 DNA손상에 의해서도 발생된다. Apoptosis가 일어나는 세포의 특징 중 하나가 DNA의 단편화와 응축 현상이다. 세포의 핵을 관찰하면 apoptosis가 진행되는 세포의 핵에서 DNA의 단편화와 응축현상을 확인 할 수 있다. 이러한 현상을 이용하여 Hoechst 33258 dye는 dsDNA의 adenine과 thymine이 풍부한 sequence에 결합한다^{42,43}).

본 실험에선 UVB가 조사된 세포에 Hoechst 33258염색을 실시하여 apoptosis가 진행되고 있는 세포의 핵을 구별하고 관찰하였다. 그 결과 UVB를 조사하고 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 복분자에서 UVB를 조사한 대조군에 비해 세포핵의 농축을 억제하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 복분자의 높은 항산화 효과로 인하여 UVB의 광독성을 억제한 것으로 추측된다.

본 연구를 통해 복분자의 항산화와 광독성 억제 효과를 확인할 수 있었지만 향후 자외선 차단과 피부손상 완화 효과 및 유전자 발현을 통한 기전 연구 등 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

복분자의 항산화 및 광독성 억제활성을 알아보기 위해 Hs68 세포주를 이용하여 세포독성, DPPH radical 소거능, 광독성 억제 활성 및 apoptosis를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 복분자 메탄을 추출물은 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포독성이 없었다.
2. 복분자의 DPPH radical 소거효과를 측정된 결과 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 에서 농도 의존적으로 유의하게 높은 항산화 효과가 있었다.
3. 복분자의 광독성 억제 활성을 알아보기 위해 Hs68 세포주의 생존 능력을 측정된 결과 대조군에 비해 6,25, 12,5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 cell viability가 증가하였다.
4. UVB를 조사하고 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 복분자에서 UVB를 조사한 대조군에 비해 세포핵의 농축을 억제하였다.

References

1. Wiseman H, Dietary influences on membrane function : importance in protection against oxidative damage and disease. *Journal of nutritional biochemistry*. 1996;7(1):2-15.
2. B Halliwell, J Gutteridge, OI Aruoma, The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*. 1987;165:215-9.
3. EN Frankel, Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*. 1996;57:51-5.
4. Moon JH, Park KH. Functional Components and Physiological Activity of Tea. *Kor. J. Tea Society*. 1995;1:177-93.
5. N Ramarathnam, T Osawa, H Ochi, S Kawakishi, The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science & Technology*. 1995;6:75-82.
6. Stempel E, Stempel R. Drug-induced

- photosensitivity.. J Am Pharm Assoc, 1973;13(4):200-4.
7. Ferguson J, Addo HA, McGill PE, Woodcock KR, Johnson BE, Frain-Bell W. A study of benoxaprofen-induced photosensitivity. Br. J. Dermatol. 1982;107(4):429-42.
 8. Lim HW. Abnormal responses to ultraviolet radiation : photosensitivity induced by exogenous agents. In: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 7th, Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, et al. (Eds), McGraw-Hill, New York 2008;1:828.
 9. Laure R, Gary FS. UV-light-induced signal cascades and skin aging. Aging Res. Rev. 2002;1:705-20.
 10. Lee JH, Lee BS, Yang MS, Byun BS, Kim WG, Kim BH, Lee SJ. Prevention of Photoaging and Wrinkle Formation in Hairless Mice Dorsal Skin by APB-03. Korean J. Food SCI. Technol. 2005;37(6):989-96.
 11. The National College of Oriental Medicine Herbology Classroom. Herbology. Seoul: Youngrimsa, 2006;694-5.
 12. Wang SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. J Agric Food Chem, 2000;48(2):140-6.
 13. Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. J Agric Food Chem, 2002;50:3495-500.
 14. Choi J, Lee KT, Ha J, Yun SY, Ko CD, Jung HJ, Park HJ. Antinociceptive and antiinflammatory effects of Niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. Biol Pharm Bull, 2003;26(10):1436-41.
 15. Park JH, Oh SM, Lee SS, Shin HK, Oh YS, Choe NH, Park JH, Kim JK. Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus coreanus* in murine macrophages. Biochem Biophys Res Commun, 2006;351(1):146-52.
 16. Lee KH, Choi EM. *Rubus coreanus* Miq. extract promotes osteoblast differentiation and inhibits bone-resorbing mediators in MC3T3-E1 cells. Am J Chin Med. 2006;34(4):643-54.
 17. Nam JH, Jung HJ, Choi J, Lee KT, Park HJ. The anti-gastropathic and anti-rheumatic effect of niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid isolated from the unripe fruits of *Rubus coreanus* in a rat model. Biol Pharm Bull. 2006;29(5):967-70.
 18. Shin TY, Kim SH, Lee ES, Eom DO, Kim HM. Action of *Rubus coreanus* extract on systemic and local anaphylaxis. Phytother Res. 2002;16(6):508-13.
 19. Kim SM, Kim EH. Changes in the skin health conditions by facial skin care and antioxidant vitamins. Kor J Aesthet Cosmetol. 2009; 7(4):111-25.
 20. Lim HJ, Yoo DY. Effects of *Danchisoyo-san* on UVB-induced Cell Damage and Gene Expression in Dermal Fibroblast. J Korean Obstet Gynecol. 2011;24(2):13-32.
 21. Lee YS. Clinical Dermatology. Ryo Moon Gak P. Co.:Seoul, 1998;296-7.
 22. Youn JI. Effects of Ultraviolet Radiation on the Skin. J Korean Asso Radiant Prot. 1995;20(3):181-6.

23. Jeon YS, Kang SM. Influence of collagen intake upon facial-skin wrinkles. *Kor J Aesthet Cosmetol*, 2009;7(2):79-94.
24. Uitto J, Fazio MJ, Olsen DR. Molecular mechanism of cutaneous aging. *J. Am. Acad. Dermatol*, 1989;21:614-22.
25. Yaar M, Gilchrest BA. A cellular and molecular mechanism cutaneous aging. *J. Dermatol. Surg. Oncol*, 1990;16(10):915-22.
26. Ritte L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev*, 2002;1(4):705-20.
27. Cimino F, Cristani M, Saija A, Bonina FP, Virgili F. Protective effects of a red orange extract on UVB-induced damage in human keratinocytes. *Biofactors*, 2007;30(2):129-38.
28. Schwartz E, Cruickshank FA, Christensen CC, Perlish JS, Lebwohl M. Collagen alteration in chronically sun damaged human skin. *Photochem. Photobiol*, 1993;58(6):841-4.
29. Chen VL, Fleischmajer R, Schwartz E, Palaia M, Timpl R. Immunochemistry of elastotic material in sun-damaged skin. *J. Invest. Dermatol*, 1986;87(3):334-7.
30. Darr D, Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology. *J invest Dermatol*, 1994;102(5):671-5.
31. Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, et al. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcyto-toxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*, 2005;118(4):743-58.
32. Moysan A, Clement LP, Michel L, Dubertret L, Morliere P. Effects of ultraviolet A and antioxidant defense in cultured fibroblasts and Keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 1996;11:192-7.
33. Mantena SK, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappaB signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radic Biol Med*, 2006;40(9):1603-14.
34. Shindo Y, Witt E, Packer L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol*, 1993;100(3):260-5.
35. Kwon KH, Cha WS, Kim DC, Shin HJ. A Research and Application of Active Ingredients in Bokbunja(*Rubus coreanus* Miquel). *Korean J. Biotechnol. Bioeng*, 2006;21(6):405-9.
36. Lee YA, Lee MW. Tannins from *Rubus coreanus*. *Kor. J. Pharmacogn*, 1995;26(1):27-30.
37. Lee MW. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanus*. *Yakhak Hoeji*, 1995;39:200-4.
38. Kim MS, Pang CG, Lee MW. Flavonoids from the leaves of *Rubus coreanus*. *Yakhak Hoeji*, 1997;41:1-6.
39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983;65(1-2):55-63.
40. You JK, Chung MJ, Kim DJ, Seo DJ, Park JH, Kim TW, Choi M. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Effects of *Paeonia suffruticosa* Water Extract. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2009;38(3):292-6.

41. Yu Y, Heo SI, Jung MJ, Wang MH. Antioxidant and Antidiabetic Effects of Various Sections of *Astragalus membranaceus*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2009;40(1):1-5.
42. Latt SA, Stetten G, Juergens LA, Willard HF, Scher CD. Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. *J Histochem Cytochem*. 1975;23(7):493-505.
43. Latt SA, Stetten G. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Histochem Cytochem*. 1976;24(1):24-33. Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis". *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 24 (1): 24-33.