

## 자외선B 노출로 인해 손상된 피부세포에 대한 돌베나무잎 추출물의 보호효과

고 아 라 · 최 송 이\* · 김 용 응\*\* · 박 건 혁\*†

울산대학교 의과대학 서울아산병원 임상약리학과

\*한국한의약연구원 K-herb연구단

\*\*대구한의대학교 의과대학 제약공학과

(2016년 1월 8일 접수, 2016년 3월 10일 수정, 2016년 3월 14일 채택)

## Protective Effects of *Pyrus pyrifolia* NAKAI Leaf Extracts on UVB-induced Toxicity in Human Dermal Fibroblasts

Ara Koh, Songie Choi\*, Yong-ung Kim\*\*, and Gunhyuk Park\*†

Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics,

Ulsan University College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul 05505, Korea

\*The K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Daejeon 34054, Korea

\*\*Department of Pharmaceutical Engineering, College of Biomedical Science, Daegu Haany University, Gyeongsangbuk-do 38610, Korea

(Received January 8, 2016; Revised March 10, 2016; Accepted March 14, 2016)

**요 약:** 피부 손상은 주로 자외선, 열, 담배 등과 같은 환경적 요인으로부터 초래되는데, 이는 활성산소종의 과생성으로 인한 피부노화와 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 돌베(*Pyrus pyrifolia* NAKAI)는 전 세계적으로 많이 소비되는 과일로서 항암, 항산화, 항염증효과가 알려져 있다. 본 연구에서는 돌베나무잎 추출물(*Pyrus pyrifolia* leaf extract, PPE)의 ultraviolet B (UVB) 스트레스에 대한 피부 섬유아세포 보호효과를 검증하였다. Lactate dehydrogenase assay와 DCF-DA를 이용한 정성분석 실험은 PPE가 인간의 섬유아세포에서 UVB 스트레스에 의해 유발된 세포독성 및 과생성된 활성산소종을 농도 의존적으로 억제할 뿐만 아니라, 미토콘드리아 기능저하, 막전위 저하, 그리고 세포사멸과정의 핵심 인자인 caspase-3 활성도 유의하게 억제함을 보여주었다. 결론적으로, PPE는 UVB 스트레스에 의해 과생성된 활성산소종을 억제시켰으며, 이로 인해 생기는 피부세포 사멸을 효과적으로 저해함을 확인하였다.

**Abstract:** Skin damage is mainly caused by environmental factors such as ultraviolet light, heat, and smoking. It is known that reactive oxygen species production is commonly involved in the pathogenesis of skin damage induced by these factors, causing skin aging. *Pyrus pyrifolia* Nakai continues to be a popular and highly consumed fruit in many countries with known beneficial effects including antitumor, antioxidative, and anti-inflammatory effects. However, there is no evidence of a therapeutic effect of *Pyrus pyrifolia* extract (PPE) against skin aging via inhibition of mitochondria-mediated apoptosis. In this study, we investigated PPE protective effect against photoaging induced by UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>) in HS68 human dermal fibroblasts. Lactate dehydrogenase assay showed that PPE significantly protected HS68 cells against UVB-induced damage in a dose-dependent manner. Other assays using DCF-DA demonstrated that PPE protected HS68 cells by regulating reactive oxygen species production. PPE also regulated

mitochondrial dysfunction and mitochondrial membrane potential induced by UVB, and inhibited UVB-induced caspase-3 activity. These results indicate that PPE protects human dermal fibroblasts from UVB-induced damage by regulating the oxidative defense system.

**Keywords:** *Pyrus pyrifolia leaf, dermal fibroblasts cell, antioxidant, mitochondria, antiapoptosis*

## 1. 서 론

피부 노화는 피부 세포 및 조직에서 나타나는 복합적 현상으로서, 그 원인에 따라 일반적으로 내인적 노화와 외인적 노화 두 가지 형태로 분류하고 있다[1,2]. 내인적 노화는 선천적 노화라고도 하며, 생물학적 시간에 따라 다양한 장기 및 조직이 비가역적으로 퇴화됨으로써 나타난다. 외인적 노화는 외부 환경 요소에 노출된 결과로서 가장 대표적인 현상은 “광노화”이며 주원인은 자외선에 대한 지속적으로 노출로 알려져 있다[1,2]. 지속적으로 자외선에 노출 시 피부 세포 안에서는 자유 라디칼(free radicals)의 과도한 생성과 함께 산화 방어 시스템의 균형이 깨지게 된다[3-5]. 이와 같은 불균형은 피부 매트릭스 조직을 파괴하며, 세포 내 구조 및 세포막 손상을 일으켜 피부주름과 같은 노화를 가속화 시킨다고 알려져 있다[3-5]. 따라서 많은 연구자 및 산업계에서는 과생성된 활성산소를 억제 가능한 소재를 찾고, 이를 이용한 피부노화 예방 건강기능식품 및 화장품 개발을 위해 노력하고 있다.

돌베나무(*Pyrus pyrifolia* NAKAI)는 장미과에 속하는 낙엽교목으로, 열매는 식용으로 널리 알려져 있다. 한의학적으로 해열(解熱) 효과가 있으며, 토사(吐瀉), 개선(疥癬) 등에 사용되어 왔다[6]. 돌베나무에는 chlorogenic acid, catechin, gallic acid, epigallocatechin, procyanidin B-3-3-O-gallate 등의 성분이 함유되어 있다고 알려져 있으며, 최근 많은 연구를 통해 다양한 활성 효과가 밝혀졌다[7-9]. 배의 과즙은 피부 보습 효과 이외에도, 알코올 분해 활성을 증가시키는 것으로 보고되었으며, 잎 추출물은 효소 반응을 이용한 항산화효과 및 대식세포에서의 항염증 효과가 있다고 보고되었다[7,9-11]. 또한, 배의 과피는 고혈당 억제 및 blood urea nitrogen과 blood creatinine의 증가 억제, 항산화 효과,  $\alpha$ -glucosidase 저해 효과 및 항균 효과가 있는 것으로 보고되었다[12,13]. 기 발표된 연구를 종합해 볼 때, 위 소재는 라디칼 소거능을 통한 항세포 사멸 억제가 가능할 것으로 충분히 예상되나, 아직 연구된 바 없어, 이를

검증 및 기능성소재로의 적용 가능성을 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (P/S)은 Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), phosphate buffer saline (PBS), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), paraformaldehyde (PFA) 등은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, CA, USA)에서 구입하였다. 5,5',6,6'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) kit는 Thermofisher Scientific (San Jose, CA, USA)에서 구입하였으며, caspase-3 fluorometric substrate kit는 Biovision (Milpitas, CA, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

### 2.2. 시료채취 및 제조

본 실험에 사용한 돌베나무잎은 2014년 6월 초순에 강원도 횡성군(37°28'35.8"N, 127°42'18.9"E)에 자생하는 수종을 대상으로 부위별로 시료를 채취하였다. 잡질을 제거한 잎에 10배의 70% 에탄올을 가하여 24 h 침출한 후 동결 건조하여 21.29%의 추출물(PPE)을 수득하였다. -20 °C에서 보관하여 실험 시 용매에 녹여 사용하였다.

### 2.3. 세포배양

Human fibroblast HS68 cell line는 ATCC (Rockville, MD)에서 분양/구매하여 사용하였으며, 37 °C의 5% CO<sub>2</sub>, 95% 조건에서 10% FBS, 1% P/S를 포함하는 high-glucose DMEM 배지를 사용하였다[14]. 세포는 2 ~ 3 일마다 1:3의 비율로 계대하여 배양하였다.

2.4. 돌베나무잎 추출물의 보호 효과 측정

2.4.1. Lactate Dehydrogenase (LDH) 측정

HS68 세포를 96-well plate에  $1.3 \times 10^4$  cells/well씩 분주하고 24 h 배양한 후, UVB (Sankyo Denki sunlamps)를  $50 \text{ mJ/cm}^2$  (40 s 동안)로 노출하였으며, 추출물  $10 \sim 200 \mu\text{g/mL}$  또는 양성대조군(vitamin C)  $100 \mu\text{M}$  농도로 24 h 처리하였다[15]. 상층액을 회수하여 LDH kit를 사용하여 시험한 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성률을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

$$\text{세포독성율(\%)} = (\text{test substance-low control} / \text{high control-low control}) * 100$$

2.4.2. Reactive Oxygen Species (ROS) 소거능 측정

ROS 측정은 DCF-DA를 사용하여 fluorescence를 측정하는 방법을 이용하였다[11]. 추출물의 ROS 소거능 측정을 위해 96-well black plate에 HS68 cell은  $1.3 \times 10^4$  cells/well씩 분주하고 24 h 배양한 후, UVB (Sankyo Denki sunlamps)를  $50 \text{ mJ/cm}^2$  (40 s 동안)로 노출하였으며, 추출물  $10 \sim 200 \mu\text{g/mL}$  농도로 1 h 동안 처리하였다. 그 후  $15 \mu\text{M}$  DCF-DA를 넣은 후 20 min 간 배양하였다. PBS로 세척 후, fluorescence excitation 485 nm, emission 530 nm로 형광강도를 측정하였다.

2.4.3. NADH Dehydrogenase 및 미토콘드리아 막전위 측정

96-well plate에 HS68 세포를  $1.3 \times 10^4$  cells/well씩 분주하고 24 h 배양한 후, UVB를  $50 \text{ mJ/cm}^2$  (40 s 동안)로 노출하였으며, 추출물  $10 \sim 200 \mu\text{g/mL}$  또는 양성대조군(vitamin C)  $100 \mu\text{M}$  농도로 24 h 처리하였다. MTT를 처리하여 3 h 배양 후, DMSO를 이용해 decrystallize시켜 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 처리가 끝난 세포에 미토콘드리아 막전위 측정을 위해 JC-1을  $5 \mu\text{M}$  농도로 1 h 처리하여, fluorescence excitation 485 nm, emission 530 nm로 형광강도를 측정하였다. 이미지는 fluorescence microscope를 이용해 촬영하였다.

2.4.4. Caspase-3 측정

100 mm dish에 HS68 세포를  $1.3 \times 10^5$  cells/well씩 분주하고 24 h 배양한 후, UVB를  $50 \text{ mJ/cm}^2$  (40 s 동안)

로 노출하였으며, 추출물  $50 \sim 200 \mu\text{g/mL}$  또는 양성대조군(vitamin C)  $100 \mu\text{M}$  농도로 24 h 처리하였다. 처리가 끝난 세포를 모은 후 lysis buffer를 이용하여 단백질을 추출한 후 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 Bradford assay로 단백질 농도를 정량한 후 caspase-3 activity kit를 통해 측정하였다.

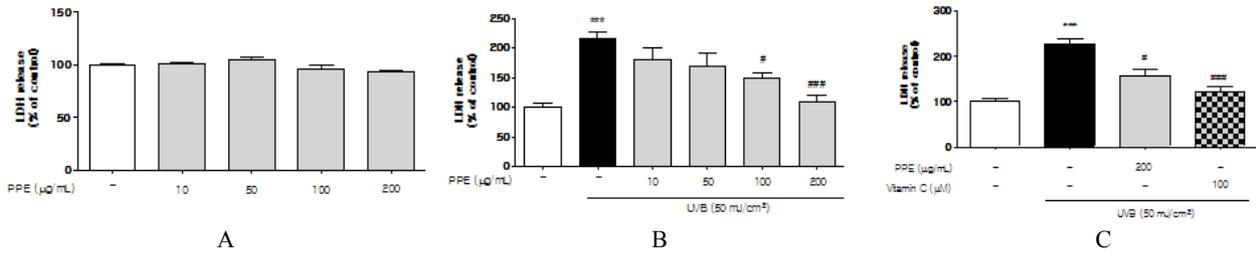
2.5. 통계처리

모든 측정값은 mean  $\pm$  standard error of mean으로 표시하였다. 본 연구의 통계처리는 Graphpad Prism 5.0 (San Diego, CA) 프로그램을 사용하여, one-way ANOVA를 이용하였으며, 사후검정은 Tukey test를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 피부섬유아세포에서 PPE의 UVB 스트레스에 대한 세포독성억제효과

UVB는 세포 내 신호전달을 통하여 면역억제, 염증 촉진, 유전자손상 등을 매개하는 것으로 알려져 있으며, 특히 이러한 신호 전달 과정의 시작은 산화적 스트레스가 중요한 역할을 한다[1-4]. UVB로 유도된 섬유아세포의 산화적 손상에 대한 PPE의 보호효과를 검토하기 위해, 먼저 PPE를 단독으로 처리하고 세포에 미치는 영향을 살펴보았다. LDH는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 하며, LDH를 내포한 세포가 파괴될 때 흘러나와 LDH가 상승한다[15]. 따라서, Figure 1A와 같이,  $10 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 의 PPE를 HS68 세포주에 24 h 동안 처리하고 LDH assay로 세포독성영향력을 측정된 결과,  $200 \mu\text{g/mL}$  농도까지 영향이 없었다. 이를 바탕으로 UVB를 조사하여 세포독성에 미치는 PPE의 보호효과를 검토하였다. Figure 1B 결과와 같이, 대조군의 세포독성이 217.35% 수준으로 증가하였으나, 이때 PPE를  $10 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 로 처리했을 때 세포독성이 181.60  $\sim$  110.45%의 농도 의존적으로 세포독성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 양성대조군 vitamin C  $100 \mu\text{M}$  농도와 비교하였을 때와 상응하는 세포독성억제 효과를 확인할 수 있었다(Figure 1C)[15]. 이 결과를 통해 PPE가 UVB에



**Figure 1.** Effects of PPE on cytotoxicity and UVB-induced cytotoxicity in human dermal fibroblasts. Cells were treated with PPE alone (A). After cells reached confluence, they were stimulated with UVB and then treated with PPE for 24 h (B). Cytotoxicity are expressed as percentages of controls. Values are the mean ± standard error of mean. \*\*\**p* < 0.001 compared the control group; #*p* < 0.05, ###*p* < 0.001 compared the UVB-alone group.

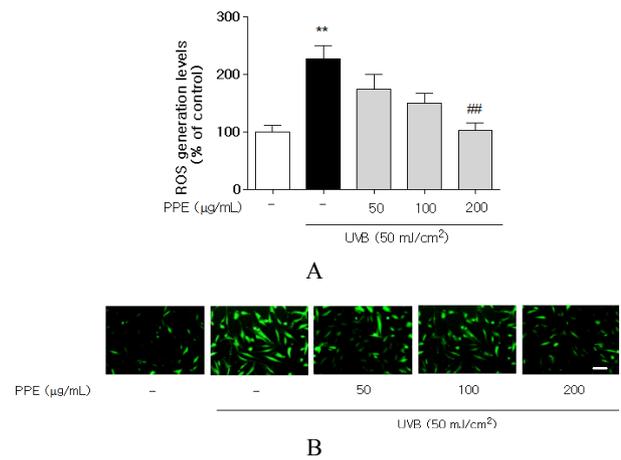
의해 유도된 피부세포독성을 강력하게 억제한다는 것을 확인하였다.

### 3.2. 피부섬유아세포에서 PPE의 UVB 스트레스에 대한 ROS 소거능 효과

자외선이 피부에 조사되는 경우 다양한 활성산소종의 생성이 증가되고, 피부세포 내 내인성 항산화 효소들의 발현은 감소하게 된다. 일차적으로 superoxide anion이 만들어지고 이는 superoxide dismutase에 의해 hydrogen peroxide를 형성하게 되며, 활성산소는 이후 철 및 구리와 같은 전이금속과 반응하여 fenton reaction을 통해 더욱더 반응성이 강한 hydroxyl radical을 형성하게 된다고 보고되어 있다[14,16]. 최근 많은 천연물들의 ROS 소거능 효과를 통한 피부보호효과 및 항노화효과를 증명한 바가 있으며, 고수추출물, 호두추출물, 금은화 추출물, 가래나무잎추출물 등이 그 예이다 [17-20]. 따라서 본 연구에서는 이러한 활성산소종이 UVB로 유도된 세포독성 및 사멸에 실질적으로 관여하는지 규명하기 위하여 세포 내 축적된 활성산소종의 양을 DCF-DA시약을 사용하여 측정하였다. Figure 2와 같이 대조군의 경우 227.51%로 ROS가 증가되었으며, 이때 PPE를 50 ~ 200 µg/mL로 처리했을 때 유의적으로 175.14 ~ 102.38% 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

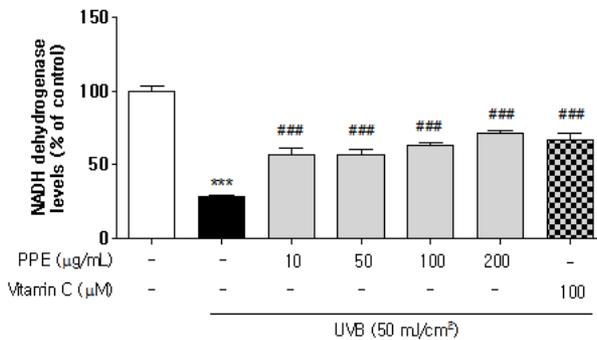
### 3.3. 피부섬유아세포에서 PPE의 UVB 스트레스에 대한 NADH Dehydrogenase 보호효과 및 미토콘드리아 막전위 억제

Krutmann의 연구에 따르면, UVB에 의한 산화적 스트레스로 유도되는 세포독성은 미토콘드리아 막전위



**Figure 2.** Effect of PPE on UVB-induced ROS generation in human dermal fibroblasts. Cells were stimulated with UVB and then treated with PPE for 1 h. ROS generation was measured by the fluorescence intensity of DCF-DA (A). Representative pictures are shown (B). Scale bar = 100 µm. The values are the mean ± standard error of mean. \*\**p* < 0.01 compared the control group; ###*p* < 0.01 compared the UVB-alone group.

의 파괴로 인해 미토콘드리아 막 투과성이 증가하면서 발생하는 것이며 또한, 피부 진피세포에서 미토콘드리아의 산화적 인산화과정이 대사활동에 중요한 것으로 알려져 있다[21]. 스트레스에 의한 노화가 진행됨에 따라 미토콘드리아 DNA 손상이 축적되어 이로부터 합성되는 복합체단백질 구조에 변형이 나타나면 에너지 생산을 위한 미토콘드리아 막전위차가 형성되지 못해 산화적 인산화 과정이 정상적으로 이루어지지 않게 되고, 이에 따라 ATP 생성이 감소하고 동시에 전자 유출이 증가하여 활성산소종이 증가하게 된다고 보고되어

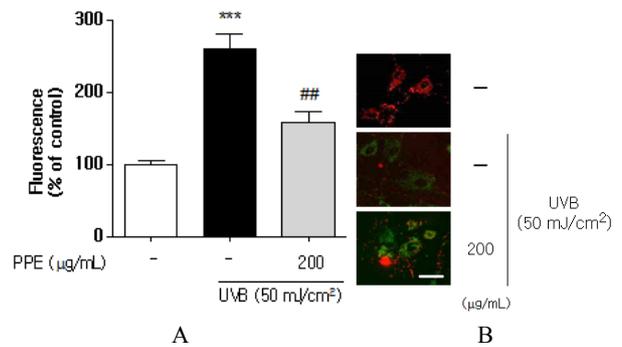


**Figure 3.** Effects of PPE on NADH dehydrogenase in human dermal fibroblasts. After cells reached confluence, they were stimulated with UVB and then treated with PPE for 24 h. The levels are expressed as percentages of controls. Values are the mean ± standard error of mean. \*\*\*  $p < 0.001$  compared the control group; ###  $p < 0.001$  compared the UVB-alone group.

있다[22]. JC-1은 낮은 농도에서는 monomer로 존재하여 녹색형광을 내며, 높은 농도에서는 J-aggregate를 형성하여 넓은 범위의 흥분스펙트럼을 나타내기 때문에 mitochondrial membrane potential을 측정하는 민감한 색소로 이용되고 있다[23]. 본 실험에서는 JC-1 시약을 통해 미토콘드리아의 막전위 측정을 하여 PPE의 효과를 평가해 보았으며, 미토콘드리아의 전자전달계에 있는 NADH dehydrogenase 활성 또한 측정하였다. 연구 결과, UVB 조사군은 NADH dehydrogenase가 대조군에 대비하여  $28.20 \pm 1.42\%$ 로 나타내어 유의하게 감소하였으며, PPE를 처리한 결과 UVB의 산화스트레스에 대하여 PPE 10 ~ 200 µg/mL 농도에서 대조군 대비하여 각각  $57.27 \pm 4.84$  과  $71.76 \pm 1.65\%$ 으로 통계적으로 유의하게 보호하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3). 뿐만 아니라, UVB 조사군의 미토콘드리아 막전위는 대조군에 대비하여  $63.32 \pm 5.16\%$ 를 나타내어 유의하게 억제되었고, PPE를 처리한 결과 UVB의 산화스트레스에 대하여 PPE 200 µg/mL 농도에서 대조군에 대비하여  $78.65 \pm 6.13\%$ 으로 통계적으로 유의하게 감소하였다(Figure 4).

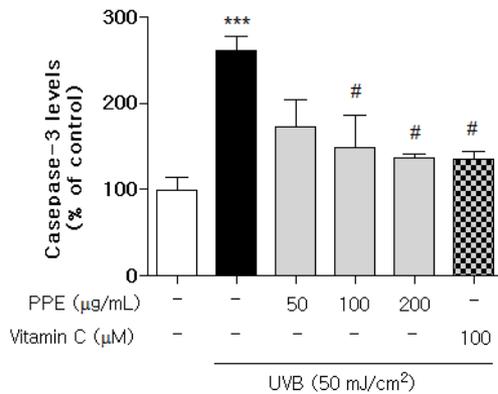
### 3.4. 피부섬유아세포에서 PPE의 UVB 스트레스에 대한 caspase-3 활성 억제효과

미토콘드리아 막전위 파괴는 미토콘드리아 막의 투과성을 증가시켜 cytochrome c와 같은 pro-apoptotic



**Figure 4.** Effects of PPE on mitochondrial membrane potential in human dermal fibroblasts. After cells reached confluence, they were stimulated with UVB and then treated with PPE for 24 h. The levels are expressed as percentages of controls (A). Representative pictures are shown (B). Scale bar = 50 µm. Values are the mean ± standard error of mean. \*\*\*  $p < 0.001$  compared the control group; ##  $p < 0.01$  compared the UVB-alone group.

mediator들을 세포질로 분비되게 한다[16]. 이로 인해 여러 apoptosis 관련 인자 및 단백질들이 활성화되면 세포사멸사가 유도된다고 알려져 있다[16]. Caspase는 세포 사멸 관련 신호전달물질로 세포 내에서 불활성화 형태인 procaspase의 상태로 존재하다가 ROS와 같은 자극에 의해 활성화 된 cytochrome c에 의해 분해되면서 활성화 된다[23]. 여러 caspase family 중 caspase-3은 caspase-8과 caspase-9의 신호를 증폭시켜 최종적으로 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다[24]. 따라서 많은 연구자들은 위의 기전을 통해 피부세포사멸억제를 보고한 바 있으며, 기 발표된 효추출물의 경우 피부세포에서 미토콘드리아손상과 동시에 B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X 및 Bcl-2의 변화가 생기고 cytochrome c의 분비로 인해 caspase-3 활성억제 효과를 보였다고 보고된 바 있다[18]. 본 연구에서는 PPE의 caspase-3 활성 억제능을 확인하다. UVB 조사로 인해 caspase-3의 활성이 대조군 대비  $260.64 \pm 17.01\%$ 로 나타나 유의한 증가를 관찰할 수 있었으며, 이에 PPE를 처리한 결과 caspase-3 수준이 PPE 50 ~ 200 µg/mL 농도에서 대조군 대비하여  $173.01 \pm 30.52$  -  $136.44 \pm 4.44\%$ 로 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 이는 vitamin C 100 µM 농도의 효과와 비슷한 정도로 확인되었다(Figure 5).



**Figure 5.** Effects of PPE on caspase-3 activity in human dermal fibroblasts. After cells reached confluence, they were stimulated with UVB and then treated with PPE or vitamin C for 24 h. The levels are expressed as percentages of controls. Values are the mean  $\pm$  standard error of mean. \*\*\*  $p < 0.001$  compared the control group; #  $p < 0.05$  compared the UVB-alone group.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 돌베나무잎추출물(PPE)의 피부세포 보호효과를 평가하기 위하여, HS68세포를 UVB 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 모델을 이용하여 피부 세포독성, ROS 생성능, 미토콘드리아 막전위의 기능 및 apoptosis 관련인자인 caspase-3 활성에 미치는 PPE의 효과를 측정하였으며 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) PPE를 HS68 세포에 10, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24 h 배양 후 LDH assay를 수행한 결과 모든 농도에서 독성이 없는 것으로 나타났다. PPE 및 UVB 처리 후 농도 의존적으로 세포독성을 감소시켰을 뿐만 아니라, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 ROS활성능이 유의하게 감소되는 것을 확인하였다.

2) UVB로 산화적 스트레스를 24 h 유도하였을 때 미토콘드리아의 막전위가 감소되었으며, PPE 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서 이러한 감소를 통계적으로 유의하게 회복시켰다. 뿐만 아니라, NADH dehydrogenase의 발현 역시 유의하게 회복시키는 것으로 나타났다.

3) PPE는 apoptosis와 관련된 지표단백질인 caspase-3의 활성을 감소시켰으며, PPE는 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ 의

농도에서 농도의존적으로 억제시켰다.

종합적으로 해석해보면, PPE는 UVB 스트레스에 의해 oxidant chemicals의 불균형의 발생으로 과잉생성된 ROS를 억제하였고, 이로 인해 단계적으로 생기는 미토콘드리아 막전위 및 기능을 안정화 시켰다. 뿐만 아니라, 피부세포사멸의 최종산출물인 caspase-3 활성을 감소시킨 효과를 보였으므로, 강력한 산화스트레스 억제를 통한 항세포 사멸효과 소재라 사료된다.

#### Acknowledgement

이 성과는 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2015R1C1A1A01054802).

#### Reference

1. H. Masaki, Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects, *J. Dermatol. Sci.*, **58**(2), 85 (2010).
2. I. P. Kaur, M. Kapila, and R. Agrawal, Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing, *Ageing. Res. Rev.*, **6**(4), 271 (2007).
3. J. Krutmann and P. Schroeder, Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective power-house model, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **14**(4), 301 (2009).
4. M. Brennan, H. Bhatti, K. C. Nerusu, N. Bhagavathula, S. Kang, G. J. Fisher, J. Varani, and J. J. Voorhees, Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin, *Photochem. Photobiol.*, **78**(1), 43 (2003).
5. H. J. Kim, K. S. Kim, and D. I. Kim, Inhibitory effects of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on ultraviolet-induced photo aging, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**(11), 1540 (2012).
6. I. G. Hwang, H. Y. Kim, K. S. Woo, S. H. Lee, J. Lee, and H. S. Jeong, Isolation and identification of the antioxidant DDMP from heated pear (*Pyrus pyr-*

- ifolia* NAKAI), *Prev. Nutr. Food. Sci.*, **18**(1), 76 (2013).
7. C. E. Lee, Y. H. Kim, B. G. Lee, and D. H. Lee, Anti-cancer and anti-microbial effect of the fraction isolated from *Pyrus ussuriensis* Leaves, *J. Korean For. Soc.*, **100**(2), 136 (2011).
  8. C. E. Lee, Y. H. Kim, B. G. Lee, and D. H. Lee, Antioxidant effect of the fraction isolated from *Pyrus ussuriensis* Leaves, *J. Korean For. Soc.*, **99**(6), 885 (2010).
  9. J. Y. Cho, C. M. Kim, H. J. Lee, S. H. Lee, J. A. Cho, W. S. Kim, K. H. Park, and J. H. Moon, Caffeoyl triterpenes from pear (*Pyrus pyrifolia* NAKAI) fruit peels and their antioxidative activities against oxidation of rat blood plasma, *J. Agric. Food Chem.*, **61**(19), 4563 (2013).
  10. H. W. Kim, K. Y. Kim, B. J. Kim, S. Y. Chiang, Y. H. Do, N. L. Nam, H. W. Jeong, J. S. Choi, and S. J. Cho, Effects of alcoholic fermentation extracts from ovary and rind of pear on human Skin, *Korea J. Herbol.*, **24**(1), 133 (2009).
  11. H. S. Lee, Effects of the Pears (*Pyrus pyrifolia* NAKAI) on alcohol detoxification, Sookmyung Women's Univ., Seoul, Korea (2009).
  12. K. H. Lee, J. Y. Cho, H. J. Lee, Y. K. Ma, J. Kwon, S. H. Park, S. H. Lee, J. A. Cho, W. S. Kim, K. H. Park, and J. H. Moon, Hydroxycinnamoylmalic acids and their methyl esters from pear (*Pyrus pyrifolia* NAKAI) fruit peel, *J. Agric. Food Chem.*, **59**(18), 10124 (2011).
  13. W. Liu, J. Liu, M. Xie, C. Liu, W. Liu, and J. Wan, Characterization and high-pressure microfluidization-induced activation of polyphenoloxidase from Chinese pear (*Pyrus pyrifolia* NAKAI), *J. Agric. Food Chem.*, **57**(12), 2376 (2009).
  14. G. Park and M. S. Oh, Acceleration of heat shock-induced collagen breakdown in human dermal fibroblasts with knockdown of NF-E2-related factor 2, *BMB Rep.*, **48**(2), 467 (2015).
  15. G. Park, H. G. Kim, Y. Sim, S. H. Sung, and M. S. Oh, Sauchinone, A lignan from *Saururus chinensis*, protects human skin keratinocytes against ultraviolet B-induced photoaging by regulating the oxidative defense system, *Biol. Pharm. Bull.*, **36**(7), 1134 (2013).
  16. G. Park, H. G. Kim, Y. O. Kim, S. H. Park, S. Y. Kim, and M. S. Oh, *Coriandrum sativum* L. protects human keratinocytes from oxidative stress by regulating oxidative defense systems, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **25**(2), 93 (2012).
  17. G. Park, H. G. Kim, S. P. Hong, S. Y. Kim, and M. S. Oh, Walnuts (seeds of *Juglandis sinensis* L.) protect human epidermal keratinocytes against UVB-induced mitochondria-mediated apoptosis through upregulation of ROS elimination pathways, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **27**(3), 132 (2014).
  18. S. H. Seo, G. S. Bae, S. B. Choi, I. J. Jo, D. G. Kim, J. Y. Shin, H. J. Song, S. J. Park, and M. O. Choi, The antioxidative and cytoprotective effect of *Lonicerae japonicae* FLOS water extracts on the ultraviolet(UV)B-induced human HaCaT keratinocytes, *Kor. J. Herbol.*, **29**(6), 63 (2014).
  19. G. Park, D. S. Jang, and M. S. Oh, *Juglans mandshurica* leaf extract protects skin fibroblasts from damage by regulating the oxidative defense system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **421**(2), 343 (2013).
  20. I. B. Afanas'ev, Signaling by reactive oxygen and nitrogen species in skin diseases, *Curr. Drug. Metab.*, **11**(5), 409 (2010).
  21. J. Krutmann and P. Schroeder, Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **14**(1), 44 (2009).
  22. G. Park, T. M. Kim, J. H. Kim, and M. S. Oh, Antioxidant effects of the sarsaparilla via scavenging of reactive oxygen species and induction of antioxidant enzymes in human dermal fibroblasts, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **38**(1), 305 (2014).
  23. S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, and S. Kumar, Old, new and emerging functions of caspases, *Cell. Death. Differ.*, **22**(4), 526 (2015).
  24. G. Park, Y. Sim, W. Lee, S. H. Sung, and M. S. Oh,

Protection on skin aging mediated by antiapoptosis effects of the water lily (*Nymphaea Tetragona* GEORGI) via reactive oxygen species scavenging

in human epidermal keratinocytes, *Pharmacology*, **97**(5-6), 282 (2016).