

자외선 B를 조사한 인간유래각질세포에서 두릅순 에탄올추출물의 산화적 스트레스 억제효과*

곽충실[†] · 양지원

서울대학교 의과대학 노화고령사회연구소

Suppressive effects of ethanol extract of *Aralia elata* on UVB-induced oxidative stress in human keratinocytes*

Kwak, Chung Shil[†] · Yang, Jiwon

Institute on Aging, Seoul National University College of Medicine, Seoul 03080, Korea

ABSTRACT

Purpose: Ultraviolet (UV)-induced oxidative stress contributes to several adverse biological effects on skin. Many phenolic phytochemicals have been shown to have antioxidant properties and protect skin cells from UV-induced oxidative damage. In this study, we investigated whether or not *Aralia elata* (AE) has a protective effect against UVB-induced reactive oxygen species (ROS), ultimately leading to photoaging. **Methods:** Phenolic content of dried AE and antioxidant properties of AE extract in 70% ethanol were determined by measuring DPPH and ABTS radical scavenging activities and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The effect of AE extract on cellular ROS generation and expression levels of oxidative stress-response proteins such as superoxide dismutase (SOD)-1, catalase, nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf)-2, and heme oxygenase (HO)-1 in UVB-irradiated (75 mJ/cm²) human keratinocytes (HaCaT) were further determined by 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate assay and Western blotting, respectively. **Results:** The total phenolic and flavonoid contents of dried AE were 20.15 mg tannic acid/g and 18.75 mg rutin/g, respectively. The IC₅₀ of AE extract against DPPH radical was 98.5 µg/mL, and ABTS radical scavenging activity and FRAP upon treatment with 1,000 µg/mL of AE extract were 41.8 µg ascorbic acid (AA) eq./mL and 29.7 µg AA eq./mL, respectively. Pretreatment with AE extract significantly reduced (p < 0.05) ROS generation compared to that in UVB-irradiated control HaCaT cells. Pretreatment with AE extract reversed reduction of Nrf-2 and SOD-1 protein expression and induction of HO-1 protein expression caused by UVB exposure in HaCaT cells, whereas it did not affect catalase expression. **Conclusion:** AE extract in 70% ethanol demonstrated a protective effect against UVB-induced oxidative stress and decreased expression of Nrf-2 and SOD-1 in human keratinocytes. These findings suggest that AE ethanol extract might have potential as a natural resource for a skin anti-photoaging product in the food and cosmetic industry.

KEY WORDS: *Aralia elata*, reactive oxygen species, superoxide dismutase, nuclear factor-erythroid 2-related factor-2, ultra violet B

서 론

고령화가 빠르게 진행됨에 따라 인체의 노화현상에 대한 기초적인 연구와 함께 노화에 따른 각 신체조직들의 기능저하를 지연시키는 방법을 찾고자 하는 많은 노력이 이루어지고 있다. 피부는 전신적인 건강상태 및 노화의 정도

를 잘 반영하기 때문에 노화관련 연구를 하기에 적절한 기관이다. 인간의 피부세포는 나이가 들어감에 따라 피부두께가 얇아지고, 색소침착이 증가하며, 건조해지고 탄력이 줄어들면서 주름이 생기고 늘어진다.¹ 피부노화는 크게 내인성 노화와 외적인 요인에 의한 외인성 노화로 나눌 수 있으나 대부분은 동시에 복합적으로 작용한다. 내인성 피부

Received: May 16, 2016 / Revised: June 7, 2016 / Accepted: June 15, 2016

*This study was supported by a grant of the Ministry of Science, ICT and Future Planning through the National Research Foundation, Republic of Korea (NRF-2014R1A2A2A01-007435).

[†]To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-2-740-8506, e-mail: kwakcs@snu.ac.kr

© 2016 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article 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.

노화는 시간적 흐름에 따라 나타나는 유전적 또는 전신적인 생물학적 변화의 일부이며 외인성 피부노화는 자외선(UV), 오염물질, 식이 등 조절 가능한 외적요인에 의한 노화이다. 외인성 노화의 주된 요인은 UV로 알려져 있고 그로 인한 노화를 광노화(photoaging)라 한다.^{2,3}

햇빛의 UV 중 UVA와 UVB는 표피를 쉽게 통과하여 진피층까지 도달해서 모두 흡수된다. UVA와 UVB는 표피와 진피에서 활성산소의 생성을 유도함으로써 세포의 DNA, 단백질, 지질 등에 손상이나 변성을 초래한다. 실제로 인간이 햇빛으로부터 받는 자외선의 95%는 UVA이지만 UVA는 세포의 DNA에 직접적으로 손상을 주지는 못하는 반면 UVB는 직접적으로 세포의 DNA에 작용함으로써 화상, 광노화, 피부암 등을 유발할 수 있어 UVB가 더 해롭다고 볼 수도 있다.³⁻⁵ UV에 의한 피부노화, 색소침착, 염증, 주름생성 등 부정적인 결과를 초래하는 과정에서 활성산소의 증가가 주된 원인으로 지목되고 있기 때문에 활성산소의 생성을 억제하거나 이를 제거할 수 있는 항산화제를 섭취하면 피부광노화를 예방 또는 개선할 수 있을 거라는 기대와 함께 많은 연구가 이루어졌다. 그 결과 카로티노이드, 비타민 E와 C, 폴리페놀 등이 풍부한 식이를 섭취하면 UV에 의해 초래되는 해로운 결과들로부터 보호해주는 효과가 있었다고 보고되었다.⁵ Offord 등⁶은 β -카로텐과 라이코펜이 비타민 E와 함께 과산화물의 생성을 막아주었으며, 여러 가지 항산화물질을 함께 섭취하였을 때 상호작용에 의하여 추가적인 효과를 보였다고 하였다.

인체는 산화적 스트레스가 과도하게 일어나지 않도록 다양한 방어기전을 갖고 있다. 인체 피부에는 카탈라아제(catalase), 수퍼옥사이드 디스무테아제(SOD), 글루타치온 퍼옥시다아제(GSH-peroxidase) 등의 항산화효소와 글루타치온, 비타민 C, 비타민 E, 플라보노이드, 유비퀴논 등의 항산화물질이 있어서 이들이 협동적으로 작용하여 ROS를 제거한다.⁷ 세포 내 산화적 스트레스에 민감하게 반응하는 nuclear factor-erythroid 2-related factor(Nrf-2)는 일부 항산화효소들의 전사인자로 UV에 의한 피부세포 사멸과 급성적인 피부화상으로부터 보호하는 데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{8,9} 따라서, Nrf-2를 활성화시키는 물질은 피부광노화를 예방하는 효과가 있을 것으로 기대된다.^{4,8}

우리나라에서는 두릅나무의 순과 어린잎은 식용으로 하고 나무껍질과 뿌리는 약용으로 쓰여 왔는데 당뇨병, 위궤양, 간염, 류마티스 관절염 등에 효과가 있다고 알려졌다.¹⁰⁻¹³ 두릅의 다양한 약효성분으로는 사포닌을 비롯하여 올리에놀산, 트리테르핀, 시스토크스테롤, 콜린, 헤데라제닌, 알칼로이드, 팔미틴산, 리놀렌산, 메틸아이크사논산,

3,4-디히드록시벤존산 및 헥사코졸 등이 알려져 있다.¹⁴⁻¹⁶ 봄철에 주로 데쳐서 나물로 먹는 두릅순은 특유의 향과 쓴맛이 있으며 비타민 C, 레티놀, 베타카로틴 같은 비타민과 K, Ca, P, Mg와 같은 무기질, 아스파라긴산 등이 풍부하며, 폴리페놀 화합물이 다량 함유되어 항산화효과가 높다고 알려져 있다.¹⁶ 두릅순에서 추출한 aralin은 암세포 사멸을 유도하는 효과가 있었고,¹⁷ 발암물질인 벤조피렌을 투여한 동물에게 두릅순 에탄올 추출물을 먹였을 때 간에서 SOD, GSH-S transferase, catalase 활성 및 혈중 α -토코페롤 농도를 증가시키는 항산화효과를 보였으며 혈중 콜레스테롤 농도는 감소시켰다고 하였다.¹⁸ 그러나, 아직까지 두릅순에 대한 생리활성연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 두릅순 에탄올 추출물의 *in vitro* 항산화효과를 측정하고, UVB를 조사한 인간각질세포(HaCaT)에서 활성산소 생성을 억제하는 효과가 있는지 확인함으로써 피부광노화를 억제할 가능성에 대하여 평가하고자 하였다. 아울러, UVB에 대한 항산화효과의 작용기전으로 Nrf2-ARE 경로 및 항산화효소들에 대한 조절과 관련이 있는지 연구하였다.

연구방법

시료의 구입, 전처리 및 추출과 분획

두릅순은 전라북도 순창군에서 재배한 참두릅으로 4월에 구입하였으며 2회 세척한 후 물기를 빼고 동결건조기(Samwon, Korea)에서 감압 하에 3일간 동결건조시킨 다음 가정용 식품분쇄기를 이용하여 분말화 하여 냉동실에 보관하였다. 두릅추출시료를 얻기 위하여 두릅 건조시료 중량의 10배 부피의 70% 에탄올(Ducksan, Korea)을 플라스크에 붓고 입구를 봉한 다음 저어주면서 실온에서 24시간 동안 2회 반복 추출하였다. 추출용액을 모아 Whatman 여과지(no.2, GE Healthcare, UK)로 거른 후 여과액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)로 35°C, 감압 하에 에탄올을 증발시켜 농축액을 얻었다. 농축액을 24시간 동결건조하여 수분을 제거함으로써 분말상태의 두릅추출시료를 획득하였고 -20°C에 냉동보관하였다가 실험에 사용하였다.

폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

동결건조한 건시료 1 g에 50 mL의 75% 에탄올을 가하고 24시간 교반한 후 Whatman 여과지(no.2)로 여과하고, 75% 에탄올로 50 mL까지 맞추어 시료 준비하였다. 총 플라보노이드 함량 측정은 AOAC에서 공인된 방법을 약간 수정한 Chae 등¹⁹의 방법에 따라 75% 에탄올추출액 100

μL 에 90% diethylene glycol 900 μL 를 첨가하고, 다시 1 N NaOH를 20 μL 를 가한 후 37°C 수조에서 1시간 동안 둔 다음 분광광도계 (Ultrospec 2100Pro, Amersham Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다. 총 폴리페놀 함량은 Singleton 등²⁰의 방법에 따라 75% 에탄올 추출액 100 μL 에 Folin-ciocalteu reagent 1 mL, 7.5%의 sodium carbonate 800 μL 를 가하고 빛을 차단하여 실온에서 30분간 방치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다.

DPPH 라디칼 제거효과 측정

대표적인 항산화능의 지표로 이용되는 DPPH 라디칼 소거능은 Yasushi 등²¹의 방법을 이용하여 측정하였다. 두릅의 70% 에탄올 추출시료를 에탄올에 녹여 여러 농도로 준비한 시료에 에탄올에 녹인 200 μM 의 DPPH 용액을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 넣지 않은 대조군의 흡광도에 비하여 시료 처리군의 감소한 흡광도의 비율에 의하여 DPPH 라디칼 소거율을 계산하였고, 농도와 소거율과의 관계식을 이용하여 소거율이 50%에 해당하는 시료농도 (IC_{50})를 계산하였다. 양성대조군 시약으로 ascorbic acid를 사용하였다.

ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium sulfate) 라디칼 제거효과 측정

ABTS 라디칼 제거효과는 Re 등²²의 방법에 따라 측정하였다. ABTS와 potassium persulfate를 증류수에 녹여 최종 농도가 각각 7 mM과 2.46 mM이 되는 혼합물을 만들어 어두운 곳에 12시간 이상 두었다. ABTS 혼합 용액 1 mL와 추출시료 50 μL 를 섞어 어두운 곳에 30 분 두었다가 734 nm에서 흡광도를 측정한 후 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 라디칼 소거 비율을 계산하였다. 양성대조시약으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

환원력 측정

시료의 환원력은 철 이온을 Fe^{+++} 에서 Fe^{++} 로 환원시키는 강도가 클수록 발색의 정도가 증가하는 원리를 이용하여 Yildirim 등²³의 방법에 따라 ferric reducing antioxidant power (FRAP)를 측정하였다. PBS에 용해시킨 두릅의 70% 에탄올 추출시료 농축액을 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6)로 희석하여 100, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 준비한 다음 각 시료와 1% potassium ferricyanide를 섞은 후 50°C에서 30 분간 반응시켰다. 반응액에 10% trichloroacetic acid를 가하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액

을 0.1% FeCl_3 와 섞어 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid (AA)를 표준시약으로 사용하여 표준곡선을 그린 후 각 시료의 흡광도에 해당하는 AA 농도를 계산하여 μg AA eq./mL 단위로 표시하였다.

세포배양 및 시료처리

HaCaT 세포 (서울의대 피부과 연구실에서 분양받음)는 10% 우혈청 (FBS, v/v), 1 mM glutamine, 100 units/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin을 함유하는 DMEM 배지 (Welgene Inc., Korea)를 이용하여 37°C, 5% CO_2 세포 배양기에서 계대배양하였다. 두릅순 추출시료는 phosphate buffered saline (PBS)에 100 mg/mL 농도로 용해시킨 후 0.2 μm syringe filter로 여과한 다음 DMEM 배지로 희석하여 세포에 처리하였다.

자외선 B 조사

UVB 조사는 배양액을 제거한 후 세포를 PBS로 세척하고 세포를 살짝 덮을 만큼의 PBS를 넣은 상태에서 이루어졌다. UV 조사기 안에 세포를 넣고 TL 20W/12 RS fluorescent sun lamp (Philips, Netherlands)를 이용하여 275~380 nm (최고 290~320 nm)의 파장을 조사하였다. 이 때 lamp에서 나오는 UVC를 제거하기 위하여 TA 401/407 Kodacel filter (Kodak, USA)를 부착하여 사용하였으며, 세포에 조사되는 UV의 강도는 UV meter (Ultra-Violet Products Ltd., UVP, USA)로 측정하였다.

세포 생존율 측정

두릅순 추출시료와 UVB에 대한 세포독성 정도를 알아보기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 이용한 방법²⁴으로 세포생존율을 측정하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 일정 수만큼 심고 24시간 배양한 다음 배양액을 무혈청 DMEM으로 교환하면서 각 추출시료를 여러 농도로 처리하였다. 일정 시간 배양 후 배양액을 제거하고 MTT 용액을 첨가한 다음 37°C에서 3~4시간 배양한 후 용액을 제거하고 각 well에 200 μL 의 DMSO를 첨가하여 formazan crystals을 용해시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포에서의 ROS 생성량 측정

HaCaT 세포에서의 ROS 생성량은 Yoo 등²⁵의 방법에 따라 측정하였다. HaCaT 세포를 24-well plate에 일정하게 심고 24시간 배양 후 무혈청 DMEA 배양액에 시료를 용해시켜 교환하여 주었다. 다시 24 시간 배양 후 배양액을 제

거하고 페놀레드를 함유하지 않는 DMEM 배양액에 녹인 40 μM 의 2'-7'-dichlorofluoresceine diacetate (DCF-DA)를 첨가하고 30 분 후에 UVB (75 mJ/cm^2)를 조사하고 30 분 간 배양하였다. 각 well의 상층액을 따서 ELISA reader가 부착된 fluorometer (TECAN, Switzerland)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광도를 측정하여 대조군에 대한 비율을 구하였다. 동일한 조건에서 세포 생존율을 측정하여 보정하였다.

Western blotting

세포에서 단백질을 추출하기 위하여 배양액을 제거하고 차가운 PBS (pH 7.4)로 세척한 다음 protease inhibitor (Roche, Germany)를 포함하는 RIPA buffer (Sigma-Aldrich, USA)를 넣고 얼음 위에 두었다가 4°C, 10,000 g에서 15분 간 원심분리하여 상층액을 모은 후 Bradford 방법²⁵으로 단백질 농도를 측정하였다. 각 시료에 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (Sigma-Aldrich)를 가하고 100°C에서 5분간 끓여 준비하였다. Mini-PROTEIN system (BIO-Rad, USA)를 이용하여 10% SDS polyacrylamide gel의 각 well에 단백질 양이 동일하도록 준비한 시료를 넣고 전기영동을 시행하였으며 이어서 Amersham Hybond P 0.45 PVDF membranes (GE Healthcare Life Sci., Germany)으로 이동시켰다. Membrane을 0.1% Tween-20을 함유하는 Tris-buffered saline (TBST, pH 8.0)에 탈지분유를 5%가 되도록 용해시킨 blocking solution에 넣어 실온에서 1 시간 동안 blocking 한 후 희석시킨 1차 항체 용액 (anti-catalase, anti-Nrf2, anti-HO-1, anti-SOD-1 (Santa Cruz Biotech., USA), anti- β -actin (Sigma-Aldrich))에 담가 4°C에서 18시간 두었다. Membrane을 TBST로 세척 후 실온에서 2차 항체(Santa Cruz Biotech.)에 2시간 동안 노출시킨 다음 세척하고 ECL solution (Pierce, USA)을 뿌려 LAS-4000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm, Japan)을 이용하여 단백질 밴드를 확인하고 이미지를 저장하였다.

통계분석

모든 실험결과는 3회 이상 반복하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 또한, 시료들 간의 실험 측정치를 비교하기 위하여 Statistics Analysis Systems (SAS) 통계프로그램 (ver. 9.4, SAS Institute, Cary, USA)을 이용하여 ANOVA-test 실시 후 Duncan test를 실시하여 $p < 0.05$ 일 때 대조군에 비하여 각 실험군이 통계적으로 유의한가를 평가하였다.

결 과

두릅순의 추출수율 및 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량

두릅순의 동결건조 수율은 11.1%였고, 건조시료로부터 70% 에탄올로 추출한 결과 수율은 33.0%였다. 두릅순 건조시료는 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드를 각각 20.15 mg tannic acid (TA)/g와 18.75 mg rutin (RT)/g 함유하고 있었다 (Table 1).

두릅순 추출물의 항산화효과

두릅순 70% 에탄올 추출물을 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 21.7%, 49.6%, 90.9%의 DPPH 라디칼을 제거함으로써 라디칼을 50% 제거하는 IC_{50} 농도는 98.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 이는 3.6 μg ascorbic acid (AA)/mL가 나타내는 효과에 해당하였다. 양성대조시약으로 사용한 ascorbic acid의 DPPH 라디칼에 대한 IC_{50} 은 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다 (Table 2).

두릅순 추출시료의 ABTS 라디칼 소거능은 200, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 10.1%, 24.5%, 44.6%로 이는 각각 9.4 μg AA eq./mL, 23.0 μg AA eq./mL, 41.8 μg AA eq./mL에 해당하는 효과였다 (Table 3). 또한, 두릅순 추출시료가 Fe^{+++} 를 Fe^{++} 로 환원시키는 환원력을 측정한 결과 200, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 6.4 μg AA eq./mL, 14.6 μg AA eq./mL, 29.7 μg AA eq./mL의 효과를 나타내

Table 1. The content of total phenolics and flavonoids in *Alalia elata*

Total phenolic content (mg tannic acid/g dry wt)	20.15 \pm 0.13
Total flavonoid content (mg rutin/g dry wt)	18.75 \pm 0.42

Values are expressed as mean \pm SD.

Table 2. DPPH radical scavenging activity of AE

DPPH radical scavenging activity				
AE ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	%	AA ¹⁾ eq. $\mu\text{g}/\text{mL}$	AA ¹⁾ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	%
50	21.7 \pm 1.0	1.6 \pm 0.6 ^{c2)}	2	36.1 \pm 3.5
100	49.6 \pm 2.4	3.6 \pm 1.0 ^b	3	47.8 \pm 4.4
150	79.2 \pm 3.8	5.4 \pm 1.0 ^a	4	69.8 \pm 6.4
200	90.9 \pm 0.5	5.9 \pm 1.0 ^a	8	96.8 \pm 0.2
IC_{50}	98.5 \pm 4.4		IC_{50}	3.0 \pm 0.2

Values are expressed as mean \pm SD. AE: 70% ethanol extract *Alalia elata*.

1) ascorbic acid, positive control 2) Means sharing the same alphabet in superscripts are not significantly different at each treated concentration at $p < 0.05$ by ANOVA and Duncan's multiple range test.

었다 (Table 3).

HaCaT 세포에서 두릅순 추출물의 세포독성 및 UVB에 의한 ROS 생성 억제효과

두릅순 70% 에탄올 추출물을 10~300 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 HaCaT세포에 24시간 동안 처리한 경우 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 세포생존율이 감소하지 않아 해당 농도 범위에서 세포독성은 없는 것으로 판단하였다 (Fig. 1A).

세포에 시료처리 없이 UVB를 조사하고 (UVB+ 대조군) 30분 후에 ROS를 측정한 결과 UVB- 대조군에 비하여 ROS 생성량이 2배 가까이 증가되었다 ($p < 0.05$). 그러나, UVB 조사 전에 두릅순 추출시료를 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 24시간 전처리한 경우 ROS 생성량은 각각 UVB+ 대조군의 86.4%, 85.5%, 89.6% 수준으로 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.05$) 두릅순 추출물의 농도에 따른 차이는

Table 3. ABTS radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP) of AE

AE ($\mu\text{g/mL}$)	ABTS radical scavenging activity		FRAP
	%	AA ¹⁾ eq. $\mu\text{g/mL}$	AA ¹⁾ eq. $\mu\text{g/mL}$
200	10.1 \pm 1.2	9.4 \pm 0.0 ^{c2)}	6.4 \pm 0.7 ^c
500	24.5 \pm 1.2	23.0 \pm 2.2 ^b	14.6 \pm 0.4 ^b
1000	44.6 \pm 3.5	41.8 \pm 4.4 ^a	29.7 \pm 1.9 ^a

Values are expressed as mean \pm SD. AE: 70% ethanol extract *Aralia elata*.

1) Ascorbic acid, positive control 2) Means sharing the same alphabet in superscripts are not significantly different at each treated concentration at $p < 0.05$ by ANOVA and Duncan's multiple range test.

없었다 (Fig. 1B). 양성대조시약으로 사용한 ascorbic acid (200 μM) 처리군의 ROS 생성량은 UVB+ 대조군의 86.0%로 두릅순 추출물 처리군과 비슷한 정도의 감소효과를 나타내었다 ($p < 0.05$). ROS 측정과 동시에 세포생존율을 측정한 결과 모든 군의 세포생존율이 90% 이상이었다 (Fig. 1B).

UVB를 조사한 HaCaT 세포에서 두릅순 추출물이 항산화효소 단백질 발현에 미치는 영향

두릅순 추출물이 UVB에 의한 ROS 생성을 억제시키는 효과를 보였기 때문에 그와 관련된 기전을 살펴보기 위하여 산화적 스트레스에 영향을 받는 전사인자인 Nrf-2와 항산화효소인 catalase, SOD-1, HO-1의 단백질 수준을 Western blot 방법으로 측정하였다. 그 결과 Nrf-2와 SOD-1의 단백질 발현량은 UVB 조사에 의하여 감소하였지만 UVB 조사 전에 두릅순 추출물을 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 경우에는 모든 농도에서 감소하지 않았으며 이때 처리 농도에 따른 차이는 없었다. 또한, HO-1의 단백질 발현량은 UVB 조사에 의하여 증가하였지만 두릅순 추출물을 처리한 경우 모든 농도에서 증가하지 않았다. 그러나, catalase 단백질 발현량은 UVB 조사와 두릅순 추출물 전처리에 의하여 영향을 받지 않았다 (Fig. 2).

고 찰

폴리페놀이나 플라보노이드는 식물에 널리 존재하는 방향족 2차 대사체로 다양한 구조와 분자량을 갖고 있으며,

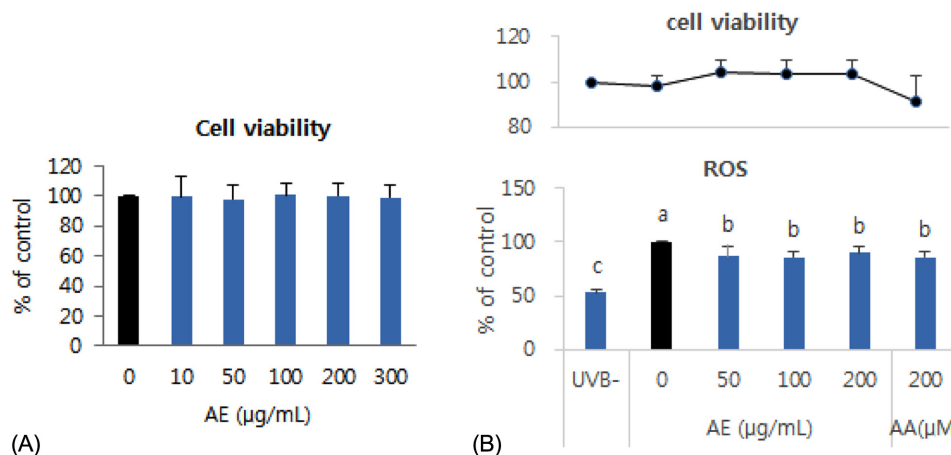


Fig. 1. Effect of AE treatment on cell viability and UVB-induced ROS generation in HaCaT cells. (A) Cell viability at 24 h treatment of AE extract in HaCaT (B) ROS generation and cell viability at 30 min after UVB (75 mJ/cm^2) irradiation to the cells pretreated with AE extract for 24 h. AE: 70% ethanol extract of *Aralia elata*, AA: ascorbic acid, positive control. Means sharing the same alphabet in superscripts on the bar are not significantly different at each treated concentration at $p < 0.05$ by ANOVA and Duncan's multiple range test.

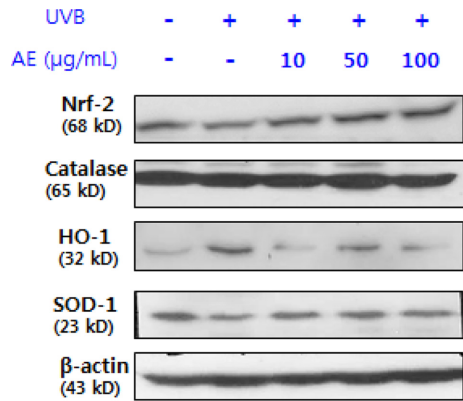


Fig. 2. Effect of AE treatment on the protein levels of oxidative stress-related enzymes in UVB-irradiated HaCaT cells. UVB (75 mJ/cm²) was irradiated to the cells pretreated with AE extract for 24 h. At further 24 h incubation, the cells were harvested and the protein levels of Nrf-2, catalase, HO-1 and SOD-1 were determined by Western blotting.

페놀 화합물의 수산기가 단백질 등의 분자와 결합함으로써 항산화, 항암, 항균, 항염증 효과 등의 다양한 생리활성을 나타낸다.²⁶ 폴리페놀의 항산화효과는 강한 환원력 때문이며 ROS에 의한 세포손상을 막아주고 박테리아의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있으며,^{2,27,28} anthocyanidines, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones 등의 플라보노이드는 그 구조에 따라 항산화효과 또는 항균효과가 있는 것으로 알려져 있다.²⁹

DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼은 비교적 안정된 자유라디칼로 식물추출물의 항산화활성 측정에 많이 이용되고 있다. DPPH는 음이온 라디칼을 제거하는 활성을 측정하는 반면 ABTS는 양이온 라디칼을 제거하는 활성을 측정할 수 있으며 친유성과 친수성 물질 모두의 활성을 측정할 수 있기 때문에 두 가지 방법에 의한 결과가 상이할 수도 있다.³⁰ 본 연구에서 두릅순 추출물을 200 μg/mL의 농도로 처리하였을 때 DPPH 라디칼은 90.9% 제거한 반면 ABTS 라디칼은 10.1% 밖에 제거하지 못하였지만 양성대조군인 ascorbic acid의 효과를 기준으로 환산하여 비교해 보면 각각 5.9 μg AA eq./mL과 9.4 μg AA eq./mL이었다.

여러 연구에서 식물추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 폴리페놀 함량이 높을수록 우수하여 양의 상관관계를 매우 높은 것으로 보고되었으며,³¹⁻³³ 차를 비롯한 식물에 존재하는 일부 폴리페놀들은 비타민 C나 E보다도 더 높은 항산화효과를 나타낸다고 알려졌다.⁷ 본 연구에서 두릅순의 총 폴리페놀 함량은 20.15 mg TA/g dry wt으로 시금치 (10.91 mg TA/g dry wt)보다는 높았고 돌나물 (23.77 mg TA/g dry wt), 돌미나리 (22.53 mg TA/g dry wt)와 비슷한 수준이었다.³⁴ 또한, 두릅의 DPPH 라디칼 소거능의 IC₅₀은

98.5 μg/mL로 뽕잎 (102.6 μg/mL), 박잎 (108.6 μg/mL), 토란잎 (96.1 μg/mL)과 비슷한 수준이었고, 두릅순의 환원력은 1000 μg/mL 농도에서 29.7 μg AA eq./mL의 효과를 보였는데 이는 들깨송이 (30.8 μg AA eq./mL), 오디 (29.7 μg AA eq./mL), 호박잎 (26.4 μg AA eq./mL)과 비슷한 수준이었다.³⁵

Cha 등¹⁶은 두릅순의 열수추출물, 70% 에탄올 추출물, 80% 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 (tannic acid eq.) 함량을 측정한 결과 각각 10.7%, 16.2%, 16.7%로 70% 에탄올 및 80% 메탄올 추출물이 열수 추출물보다 높았으며, 70% 에탄올 추출물의 DPPH 소거능은 250, 500, 1000 μg/mL에서 각각 36.9%, 67.0%, 89.8%였다고 하였다. 본 연구에서는 두릅순 70% 에탄올 추출물이 200 μg/mL에서 90.9%의 DPPH 라디칼 소거능을 보여 이들의 연구결과에 비하여 월등히 높은 항산화효과를 나타내었다.

피부에 UV를 쏘이면 피부가 손상되는데 이는 UV로 인하여 증가한 ROS가 세포 내의 DNA, 단백질, 세포막 지질의 산화적 손상을 야기하는 동시에 피부의 세포외기질의 주성분인 콜라겐과 엘라스틴, 히알루론산 등을 분해시키는 효소들의 발현을 증가시키는 것이 주된 원인이다.² 피부에는 항산화시스템이 존재하여 어떤 자극에 의하여 ROS 생성이 증가한 경우 빠르게 제거하는 기전이 작동하고 있지만 반복적이거나 너무 강한 자외선을 받게 되면 피부손상을 피할 수가 없다. 따라서, 자외선에 의한 피부광노화를 방지하기 위해서는 ROS의 생성을 억제시키거나 빠르게 제거하는 방법을 찾는 것이 필요하다.³⁶

피부는 외부로부터 인체를 방어하는 1차 방어벽이기 때문에 방어시스템이 발달되어 있으며 그 중 하나인 항산화시스템이 표피에 잘 발달되어 있다. 동물실험 연구 결과 무모쥐의 표피는 진피보다 catalase, GSH-peroxidase, GSH-reductase 활성이 각각 49%, 86%, 74% 더 높았으며, 항산화제인 α-토코페롤, ubiquinol, ubiquinone, ascorbic acid, GSH 등은 24~95% 더 높았다고 하였다.³⁷ 또, 여러 연구 보고^{37,38}에 의하면 UV를 피부에 1회 조사하였을 때에는 표피에 존재하는 항산화효소들의 활성과 항산화 물질들의 농도가 감소되었지만, 장기간 반복적으로 조사하였을 때에는 이들 효소들의 활성이 오히려 증가하기도 하였다. 피부에 UV를 쏘이면 15분 이내에 H₂O₂와 OH·라디칼이 증가하여 60분까지 지속되는데,⁷ 이 때 항산화효소 및 항산화물질들이 ROS를 제거하느라 소모되어 양적으로 감소할 뿐 아니라 ROS나 UV가 항산화효소들을 손상시키기 때문에 효소활성은 점차 떨어진다고 하였다.^{39,40} Shindo 등³⁷은 무모쥐에게 최소홍반선량의 10배에 달하는 강한 UV를 1회 조사하고 4~5시간 지났을 때 측정한 catalase 활

성은 72~88%, SOD 활성은 36~48%, α -토코페롤 함량은 30%, ascorbic acid는 53% 감소하였다고 보고하였다. ROS는 어떤 자극에 의하여 일시적으로 생성되었다가 빠르게 제거되기 때문에 여러 연구들^{2,36}과 같이 본 연구에서도 UVB 조사 후 30 분에 ROS를 측정하였고 산화적 스트레스와 관련된 단백질들의 발현에 미치는 영향은 24 시간 후에 측정함으로써 측정 시점에 있어서 차이가 있었다. 그러나, ROS와 이들 단백질들은 UVB를 조사한 직후부터 상호적으로 영향을 주었을 것으로 생각된다.

SOD는 세포내 항산화효소의 하나로 산화적 손상으로부터 방어하는 데 있어서 결정적인 역할을 하는 효소이다. SOD는 O_2^- 라디칼을 O_2 와 H_2O_2 로 전환시켜 O_2^- 라디칼을 제거하는 동시에 $OH\cdot$ 라디칼을 생성하는 Haber-Weiss 반응을 억제시키기도 하는데 $OH\cdot$ 라디칼은 매우 공격적인 라디칼로 세포 구성물질을 손상시키는 매우 위협적인 물질이다.^{41,42} H_2O_2 는 금속이온 존재 시 쉽게 $OH\cdot$ 라디칼로 전환되는데 catalase가 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 전환시켜 제거한다.⁷ 여러 연구에서 UVB를 조사한 HaCaT 세포에서 Cu,Zn-SOD (SOD-1)는 초기방어단계에서 중요한 역할을 수행하기 때문에⁴² UVB 조사 후 SOD-1 단백질 수준과 활성이 감소되었으며,^{40,43} catalase 활성과 GSH의 농도도 감소되었다고 하였다.⁴⁰

반면 HaCaT 세포에 중국차잎의 70% 에탄올 추출물을 전처리하고 UVB를 조사하였을 때 대조군에 비하여 ROS 생성 및 지질산화량은 감소하였고, UVB에 의하여 감소되었던 catalase, SOD, GSH-peroxidase의 mRNA 발현은 증가되었다.⁴⁴ Jeon 등⁴⁵은 널리 알려진 폴리페놀 화합물의 하나인 (+)-catechin을 함유하는 식이를 BALB/c 생쥐에게 4 주간 섭취시켰더니 피부조직에서의 SOD와 catalase 활성은 일반식이를 섭취한 대조군보다 낮아진 반면 GSH-peroxidase 활성은 높아졌고, 이어서 UV를 조사하고 24 시간과 48 시간 후에 측정한 SOD와 GSH-peroxidase 활성은 모두 대조군보다 높았으나 catalase 활성은 48시간에서만 대조군보다 높았다. 또, UV 조사 후 48시간이 경과하였을 때 대조군의 피부는 손상이 심하고 표피가 두꺼워져 있었으나 catechin을 섭취한 군은 거의 정상군과 비슷하였다고 하였다. 본 연구에서는 항산화효소들의 활성은 측정하지 않아 이들 연구결과와 직접적인 비교는 어렵지만 폴리페놀을 다량 함유하고 있는 두릅순 추출물을 전처리하고 UVB 조사 후 24시간에 측정한 SOD-1의 단백질 수준이 대조군에 비하여 높았다는 것은 활성이 증가하였다는 결과와 상통하는 것으로 볼 수 있겠다.

최근, Patwardhan 등⁹은 플라보노이드 함량이 높은 클로버 추출분획을 피부섬유아세포 (HDF)에 전처리하고 UVB

를 조사하였을 때 UVB를 조사한 대조군에 비하여 ROS 수준과 DNA 손상이 유의하게 감소하였고, 항산화효소들의 수준은 더 높았으며 UVB에 의해 유도된 Nrf-2와 HO-1의 과발현이 억제됨으로써 UVB로부터 피부를 보호하는 기능이 있다고 보고하였다. Kim 등⁴도 한국산 고들빼기 에탄올 추출물을 HaCaT 세포에 전처리하고 UVB를 조사한 결과 Nrf-2, SOD-1, HO-1의 mRNA 발현과 단백질 수준이 농도 의존적으로 증가되었다고 하였다. 전사인자인 Nrf-2는 안정상태에서는 Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1)과 결합하여 있다가 산화적 스트레스가 증가하면 분리되어서 핵 안으로 들어가 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 GSH-S-transferase, heme oxygenase (HO)-1, NAD(P)H:Quinine oxidoreductase-1 등 해독작용을 하는 효소들의 발현을 조절함으로써 산화적 스트레스에 의한 악영향을 최소화하도록 한다.^{8,9} 그러나, UVB 조사 시 피부세포에서 Nrf-2의 반응과 그 역할에 대하여는 아직 논란이 많은 상태로 UV의 종류, 강도, UV 조사 후 경과 시간 등에 따라 다른 결과를 보인다고 알려져 있다.⁸

HO-1은 잠재적 산화물질인 헴을 항산화물질인 빌리버딘과 CO, Fe^{++} 로 분해시키는 효소이며 이 때 생성된 빌리버딘은 빌리루빈으로 전환된다.⁴⁶ HO-1은 산화적 스트레스에 매우 민감한 효소로 라디칼 생성을 촉진하거나 GSH를 소모시키는 조건인 UV, H_2O_2 , 2가의 금속, 산화물질 등에 의하여 유도되는데 UV의 경우 UVB보다는 UVA에 의하여 발현이 증가한다고 알려져 있다.^{46,47} 본 연구에서는 UVB 조사 시 HO-1의 단백질 발현이 증가되었는데 두릅순 추출물을 전처리한 경우에는 HO-1의 발현이 증가하지 않았다. 두릅순 추출물의 항산화작용에 의하여 세포 내 산화적 스트레스 증가가 억제되었기 때문으로 해석된다. 그런데, HaCaT 세포에 두릅순 추출물을 전처리하고 UVB를 조사한 직후에 측정한 ROS 생성량은 UVB+ 대조군에 비하여 10~15%의 미약한 감소가 있었지만 24 시간 후에 세포 내 산화적 스트레스와 관련성이 깊은 Nrf-2, SOD-1, HO-1 등의 단백질 발현에 미치는 영향은 더욱 분명하게 나타났다. 이는 UVB 조사로 인한 세포 내 ROS의 생성량을 초기에 조금만 줄여주어도 시간이 지나 축적되어 나타나는 악영향으로부터 세포를 보호할 수 있음을 의미한다.

두릅순의 항산화효과에 대한 유효성분은 확실하게 알려지지 않았지만 4 개의 flavonol glycoside (3개의 quercetin glycoside, 1개의 kaempferol 유도체)가 추출 확인된 바 있으며 그 중 quercetin 3,7-di-O- α -rhamnopyranoside가 가장 우수한 항산화효과를 보였다고 보고되었다.¹³ 따라서, 두릅순에 함유되어 있는 항산화효능의 여러 페놀 화합물들이 피부각질세포에서 UVB 조사에 의한 ROS 생성을 억

제함으로써 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 다양한 광노화적 변화로부터 피부를 보호할 수 있을 것으로 기대된다.

이상의 연구결과들은 두릅순 추출물이 자외선에 의한 피부손상을 억제하는 피부건강기능성식품의 개발에 이용될 수 있는 가능성을 제시하였다. 향후 후속연구를 통하여 보다 장기적으로 UVB를 반복적으로 조사하는 *in vitro* 및 *in vivo* 시스템에서 두릅순 추출물이 피부손상이나 노화의 특성을 억제하는 효과를 보이는지에 대하여 추가 연구를 할 필요가 있으며 그 효능물질을 찾는 연구 또한 필요하다.

요 약

두릅순에서 얻은 70% 에탄올 추출물의 *in vitro* 항산화 효과를 측정하고, UVB에 의한 피부광노화를 유도하는 주요 원인인 ROS의 생성을 억제하는 효과가 있는지 알아보기 위하여 인간유래각질세포 (HaCaT)를 이용하여 실험을 수행하였다. 두릅순의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 20.15 mg tannic acid/g dry wt, 18.75 mg rutin/g dry wt 이었고, 70% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼을 소거능 (IC₅₀)은 98.5 µg AA eq./mL이었으며, 1,000 µg/mL 농도에서 ABTS 라디칼 소거능과 환원력 (FRAP)은 각각 41.8 µg ascorbic acid (AA) eq./mL과 29.7 µg AA eq./mL로 우수한 항산화효과를 보였다. 두릅순 추출물을 HaCaT 세포에 24시간 전처리했을 때 UVB 조사에 의한 ROS 생성이 유의하게 감소되었으며, 산화적 스트레스에 민감하게 반응하는 전사인자인 Nrf-2와 각질세포에서 ROS를 제거하는 역할을 하는 주요 항산화효소인 SOD-1의 단백질 수준의 발현은 증가한 반면, UVB 조사에 의하여 증가하였던 HO-1의 단백질 발현은 감소되었다. 그러나, catalase의 단백질 발현에는 영향을 주지 못하였다. 본 연구결과는 두릅순 70% 에탄올 추출물에 함유된 항산화효능이 우수한 어떤 페놀화합물들이 UVB 조사로 인하여 생성된 ROS를 직접적으로 제거할 뿐 아니라 각질세포에 존재하는 방어 시스템의 활성화를 통하여 산화적 스트레스로 인한 악영향을 막아줄 가능성을 제시하고 있다. 따라서, 두릅순 70% 에탄올 추출물은 UVB에 의한 피부손상 및 피부광노화를 억제하는 기능성식품 및 화장품 소재로 이용될 수 있을 것이다.

References

- Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev* 2002 123(7): 801-810.
- Yoo HG, Lee BH, Kim W, Lee JS, Kim GH, Chun OK, Koo SI, Kim DO. Lithospermum erythrorhizon extract protects keratinocytes and fibroblasts against oxidative stress. *J Med Food* 2014 17(11): 1189-1196.
- Debaq-Chainiaux F, Leduc C, Verbeke A, Toussaint O. UV, stress and aging. *Dermatoendocrinol* 2012 4(3): 236-240.
- Kim M, Park YG, Lee HJ, Lim SJ, Nho CW. Youngiasides A and C isolated from *Youngia denticulatum* inhibit UVB-induced MMP expression and promote type 1 procollagen production via repression of MAPK/AP-1/NF-κB and activation of AMPK/Nrf2 in HaCat cells and human dermal fibroblasts. *J Agric Food Chem* 2015 63(22): 5428-5438.
- Fernández-García E. Skin protection against UV light by dietary antioxidants. *Food Funct* 2014 5(9): 1994-2003.
- Offord EA, Gautier JC, Avanti O, Scaletta C, Runge F, Krämer K, Applegate LA. Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2002 32(12): 1293-1303.
- Chen L, Hu JY, Wang SQ. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *J Am Acad Dermatol* 2012 67(5): 1013-1024.
- Marrot L, Jones C, Perez P, Meunier JR. The significance of Nrf2 pathway in (photo)-oxidative stress response in melanocytes and keratinocytes of the human epidermis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008 21(1): 79-88.
- Patwardhan J, Bhatt P. Ultraviolet-B protective effect of flavonoids from *Eugenia caryophyllata* on human dermal fibroblast cells. *Pharmacogn Mag* 2015 11 (Suppl 3): S397-S406.
- Hwang E, Lee DG, Park SH, Oh MS, Kim SY. Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type I and MMP-1 expression. *J Med Food* 2014 17(9): 985-995.
- Wang M, Xu X, Xu H, Wen F, Zhang X, Sun H, Yao F, Sun G, Sun X. Effect of the total saponins of *Aralia elata* (Miq) Seem on cardiac contractile function and intracellular calcium cycling regulation. *J Ethnopharmacol* 2014 155(1): 240-247.
- Shin KH, Cho SY, Lee MK, Lee JS, Kim MJ. Effects of *Aralia elata*, *Acanthopanax cortex* and *Ulmus davidiana* water extracts on plasma biomarkers in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004 33(9): 1457-1462.
- Kim YH, Im JG. Effect of saponin from the shoot of *Aralia elata* in normal rats and streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1999 28(44): 912-916.
- Suh SJ, Jin UH, Kim KW, Son JK, Lee SH, Son KH, Chang HW, Lee YC, Kim CH. Triterpenoid saponin, oleanolic acid 3-O-beta-D-glucopyranosyl(1->3)-α-L-rhamnopyranosyl(1->2)-α-L-arabinopyranoside (OA) from *Aralia elata* inhibits LPS-induced nitric oxide production by down-regulated NF-κB in raw 264.7 cells. *Arch Biochem Biophys* 2007 467(2): 227-233.
- Lee JH, Jeong CS. Suppressive effects on the biosynthesis of inflammatory mediators by *Aralia elata* extract fractions in macrophage cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2009 28(3): 333-341.
- Cha JY, Ahn HY, Eom KE, Park BK, Jun BS, Cho YS. Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts. *J Life Sci* 2009 19(5): 652-658.
- Tomatsu M, Ohnishi-Kameyama M, Shibamoto N. Aralin, a new

- cytotoxic protein from *Aralia elata*, inducing apoptosis in human cancer cells. *Cancer Lett* 2003 199(1): 19-25.
18. Chung CK, Jung ME. Ethanol fraction of *Aralia elata* Seemann enhances antioxidant activity and lowers serum lipids in rats when administered with Benzo(a)pyrene. *Biol Pharm Bull* 2003 26(10): 1502-1504.
 19. Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH. Determination of flavonoid content in citrus. In: *Standard Food Analysis*. Seoul: Jigumoonwhasa; 2002. p. 581-582.
 20. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999 299: 152-178.
 21. Senba Y, Nishishita T, Saito K, Yoshioka H, Yoshioka H. Stopped-flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and model compound. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1999 47(10): 1369-1374.
 22. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999 26(9-10): 1231-1237.
 23. Yildirim A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agric Food Chem* 2001 49(8): 4083-4089.
 24. 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.
 25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 72(1-2): 248-254.
 26. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 1997 2(4): 152-159.
 27. Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakishi S. The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat Res* 1992 281(2): 77-80.
 28. Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Shimamura T. The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett Appl Microbiol* 1989 8(4): 123-125.
 29. Middleton E Jr, Kandaswami CC. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol* 1994 48(11): 115-119.
 30. Kang MH, Park CG, Cha MS, Seong NS, Chung HK, Lee JB. Component characteristics of each extract prepared by different extract methods from by-products of *Glycyrrhiza uralensis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2001 30(1): 138-142.
 31. Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 2001 49(7): 3420-3424.
 32. Bekir J, Mars M, Souchart JP, Bouajila J. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food Chem Toxicol* 2013 55: 470-475.
 33. Kwak CS, Lee KJ, Chang JH, Park JH, Cho JH, Park JH, Kim KM, Lee MS. In vitro antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extracts from Korean sweet potato leaves and stalks. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2013 42(3): 369-377.
 34. Park SC, Lee MS, Kim HS. Investigate on aging-delay and aging-related disease prevention factors in Korean foods and construct database [Report to Ministry of Agriculture and Forestry]. Seoul: Seoul National University Medical Institute; 2004.
 35. Lee MS, Jeong HK, Kwak CS. A study on the systemic recording of Korean healthy traditional foods in Honam district and its cultural commercialization [Report to Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs: 11-1543000-000118-01]. Daejeon: Hannam University; 2013.
 36. Ham SA, Hwang JS, Kang ES, Yoo T, Lim HH, Lee WJ, Paek KS, Seo HG. Ethanol extract of *Dalbergia odorifera* protects skin keratinocytes against ultraviolet B-induced photoaging by suppressing production of reactive oxygen species. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015 79(5): 760-766.
 37. 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): 260-265.
 38. Shindo Y, Hashimoto T. Antioxidant defence mechanism of the skin against UV irradiation: study of the role of catalase using acatalasaemia fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 1995 287(8): 747-753.
 39. Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol* 1994 102(1): 122-124.
 40. Piao MJ, Kang KA, Kim KC, Chae S, Kim GO, Shin T, Kim HS, Hyun JW. Diphenylmethoxyphenol attenuated cell damage against UVB radiation via enhancing antioxidant effects and absorbing UVB ray in human HaCaT keratinocytes. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013 36(2): 680-688.
 41. Liochev SI, Fridovich I. The role of O₂⁻ in the production of HO₂[·] in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 1994 16(1): 29-33.
 42. Sasaki H, Akamatsu H, Horio T. Protective role of copper, zinc superoxide dismutase against UVB-induced injury of the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Invest Dermatol* 2000 114(3): 502-507.
 43. Hashimoto Y, Ohkuma N, Iizuka H. Reduced superoxide dismutase activity in UVB-induced hyperproliferative pig epidermis. *Arch Dermatol Res* 1991 283(5): 317-320.
 44. Song JL, Gao Y. Protective effects of *Lindera coreana* on UVB-induced oxidative stress in human HaCaT keratinocytes. *Iran J Pharm Res* 2014 13(4): 1369-1378.
 45. Jeon SE, Choi-Kwon S, Park KA, Lee HJ, Park MS, Lee JH, Kwon SB, Park KC. Dietary supplementation of (+)-catechin protects against UVB-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003 19(5): 235-241.
 46. Panchenko MV, Farber HW, Korn JH. Induction of hemeoxygenase-1 by hypoxia and free radicals in human dermal fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 278(1): C92-C101.
 47. Obermüller-Jevic UC, Schlegel B, Flaccus A, Biesalski HK. The effect of β -carotene on the expression of interleukin-6 and heme oxygenase-1 in UV-irradiated human skin fibroblasts in vitro. *FEBS Lett* 2001 509(2): 186-190.