

Improving the efficacy of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on ultraviolet-induced photoaging

Hee Kyoung Jung, Mi Ok Choi, Bae Jin Kim, Seung Kyeong Jo, Yoo Seok Jeong*
Biohealth Convergence Center, Daegu Technopark, Daegu 704-801, Korea

야관문 에탄올 추출물의 자외선 노출에 의한 피부 광노화 개선 효과

정희경 · 최미옥 · 김배진 · 조성경 · 정유석*
(재)대구테크노파크 바이오헬스융합센터

Abstract

This study evaluated the improving efficacy of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on skin photoaging induced by ultraviolet (UV) irradiation. The total polyphenol and flavonoid contents of the extract were respectively 134.98±1.70 and 16.20±0.05 mg/g, respectively. The superoxide anion radical scavenging activity and electron-donating ability of the extract were shown to be dependent on concentration, and the antioxidant ability was shown to be more effective in superoxide anion radical scavenging activity than in electron-donating ability under the same concentration conditions. In the *in vivo* test conducted using hairless mouse with skin photoaging induced by UVB irradiation, the skin erythema of the groups treated with the extract (AS) reduced to 28% of the control, and the skin moisture content increased to 131%. The extract treatment of the UV-damaged skin improved the morphological and histopathological state of the skin. Furthermore, the SOD, GST and CAT activities in the skin tissue of the AS group increased, and the XO activity and TBARS generation decreased. With regard to the genes related to the photoaging skin, the expression of PAK, p38, c-Fos, c-Jun, TNF- α and MMP-3 in the skin of the AS group were found to have decreased. It was therefore concluded that *Lespedeza cuneata* ethanol extract can reduce wrinkle formation in the skin due to the regulation of the gene expression caused by the exposure to UVB light.

Key words : *Lespedeza cuneata*, antioxidant activity, photoaging, skin aging, wrinkle

서 론

생활수준의 향상으로 인해 아름답고 건강한 피부를 유지하려는 욕구가 증대되고 여가생활을 위한 야외활동시간이 증가하면서 남녀노소 불문하고 태양광선 노출로부터 야기되는 피부손상을 저해하기 위한 관심도 증가하고 있으며 이에 따른 피부노화 억제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1-3). 태양광선의 자외선(UVR, ultraviolet radiation)에 반복적이거나 장기간 노출 시 피부의 탄력 및 수분이 감소되고 주름이 형성되는 등의 피부손상이 일어나게 되며 이런 현상을 광노화(photoaging)라 부른다(1,4). UVR은 그 파장에 따라 ultraviolet A(UVA, 320~400 nm), ultraviolet

B(UVB, 280~320 nm), ultraviolet C(UVC, 200~280 nm)로 분류되며 그 중 UVB는 인체에 가장 쉽고 빠르게 영향을 나타내어 피부손상에 관여하며 건조 및 피부홍반, 색소침착, 표피비후 등의 현상과 산화적 스트레스 및 항산화기전의 불균형 유발을 통해 피부를 구성하는 지질, 단백질, 효소 등을 손상시킴으로써 염증반응과 피부암 및 광노화를 심화시켜 피부손상을 초래한다(5,6). 특히 UVB 노출에 의해 생성이 유도되는 활성산소는 광노화 원인 중 하나로 세포내 신호전달 체계를 자극하여 DNA와 지질 및 단백질과 같은 생체분자에 산화적 스트레스 유발을 통한 피부조직 손상을 야기한다(7). 또한 활성산소는 표피 각질세포와 진피 섬유아세포의 자극으로 activator protein-1(AP-1) 및 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF- κ B)의 전사인자를 활성화하고 염증관련 cytokine을 분비토록 하여 matrix metalloproteinase(MMPs)의 발현을 증가시

*Corresponding author. E-mail : carrot2p@ttp.org
Phone : 82-53-602-1885, Fax : 82-53-602-1898

키고 피부조직을 구성하는 교원질과 탄력섬유의 분해를 촉진시킴으로써 주름형성을 유발하기도 한다(8). 따라서 체내에서는 활성산소에 의해 생성 및 활성화 된 지질과산화물과 산화효소에 대한 방어로 catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD) 및 glutathione-s-transferase(GST) 등과 같은 항산화효소가 작용하며(9), vitamin C, E 및 폴리페놀류와 플라보노이드 등의 생리활성 물질이 활성산소에 의한 피부 손상을 방어 할 수 있다고 보고된 바 있다(10). 피부 광노화에 따른 피부조직 손상 및 주름의 개선에 있어 항산화 물질의 역할과 중요성에 대한 관심이 집중되면서 장기간 사용에도 부작용이 없으며, 항산화 활성을 나타낼 수 있는 천연 기능성 소재 및 이를 이용한 제품의 개발이 활발히 일어나고 있다(2,11-14). 그 중 야관문(*Lespedeza cuneata* G. Don)은 우리나라를 비롯한 일본, 중국, 대만 등 아시아에 분포하는 흔한 식물로써 민간에서는 간과 콩팥 등의 기능 보호와 조루, 기침, 천식 등 치료용 약재로써 사용되었다. 야관문은 pinitol, avicularin, trifolin, quercetin, kaempferol, vitexin과 같은 플라보노이드 등 다양한 생리활성 물질을 함유하여 항균 및 항산화 활성을 나타낼 뿐만 아니라 피부 노화억제에 유용하다고 잘 알려져 있는 vitamin E 함량이 높다(15-19). 따라서 야관문 추출물의 피부 광노화 억제(20), 항산화 및 미백효과에 대해 일부 연구가 이루어졌으나(15-18) 실질적으로 화장품 조성물 내에 첨가되어져 유효적인 피부 광노화 억제 및 개선을 나타내는지에 관한 연구결과는 보고 된 바 없다. 본 연구에서는 야관문 에탄올 추출물이 화장품 조성물에 첨가되어져 실질적으로 분자생물학적 수준에서부터 피부 형태학적 수준에까지 피부 광노화 개선에 주요하게 유효성을 나타내는지 확인하고자 야관문 에탄올 추출물의 생리 활성과 피부 광노화가 유발된 동물모델을 대상의 피부 광노화 개선 효능평가를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용되어진 야관문 에탄올 추출물(고형분 35%, 이하 야관물 추출물) 및 동물실험에 사용된 야관문 추출물을 함유한 화장품 조성물은 (주)소리소(Soriso Co., Gyeongsan, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 야관물 에탄올 추출물은 야관문 100 g에 60% 에탄올 2 L를 가하여 60°C에서 6시간 추출 후 추출액을 50°C에서 1차 감압농축 후 원심분리하고 여과를 시킨 뒤 2차 감압농축한 것을 야관물 에탄올 추출물로 하여 Table 1과 같은 배합비를 기초로 화장품 조성물을 제조하였다. 생리활성 물질의 함량 및 항산화 활성 측정에 사용되어진 시료는 상기와 동일하게 얻어진 야관문 추출물을 동결건조(FreeZone plus 12, Labconco, Kansas, MO, USA)하여 얻은 고형물을 50% ethanol에 녹여

사용하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Min의 방법(21)을 변형하여 측정하였다. 야관문 추출물 시료 1 mL에 10배 희석한 Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액 1 mL를 가하여 실온에서 5분간 방치한 후, 7.5% Na₂CO₃용액 4 mL를 가하여 1시간 동안 추가 반응시켜 microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 756 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물 함량은 tannic acid(Sigma-Aldrich)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 정량(mg of TAE/g)하였다. 총 플라보노이드 함량은 Jia 등의 방법(22)에 준하여 측정하였다. 시료 1 mL에 5% NaNO₂용액 150 µL를 가하여 실온에서 5분간 반응 후 10% AlCl₃용액 300 µL를 넣고 5분 동안 추가 반응시켰다. 반응 종료를 위하여 1 M NaOH 1 mL를 가한 다음 microplate reader를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 물질 함량은 catechin(Sigma-Aldrich)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 정량(mg of CAE/g)하여 결과를 나타내었다.

Table 1. Composition of formulations added with *Lespedeza cuneata* extract

Components	Ratio (%)	
	Base sample (vehicle)	Base sample containing <i>Lespedeza cuneata</i> extract
D. I. Water	56.75	56.55
EDTA-2Na	0.03	0.03
Allantoin	0.12	0.12
1,2-Hexanediol	3.00	3.00
Glycerin	5.00	5.00
Hydroviton 24	2.50	2.50
Konjac Mannan	5.00	5.00
Natrosol 250HHR (1%)	5.00	5.00
Hyaluronic Acid (1%)	10.00	10.00
Carbopol 940 (2%)	10.00	10.00
Ethanol	0.90	0.90
Emalex HC-40	0.70	0.70
Vitamin E Acetate	0.60	0.60
L-Arginine	0.20	0.20
Phenonip	0.20	0.20
<i>Lespedeza cuneata</i> extract (35%)		0.20
Total	100	100

항산화 활성 측정

Yoon 등의 방법(23)을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)법으로 야관문 추출물의 전자공여능(electron

donating ability, EDA)을 측정하였다. DPPH(Wako, Tokyo, Japan) 용액 5 mL에 50% ethanol을 이용하여 0.05, 0.1, 0.5, 0.75, 1 mg/mL의 농도로 용해시킨 야관문 추출물 0.5 mL를 혼합한 다음 15분 반응 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정되어진 흡광도는 다음 식을 통해 계산하여 전자공여능을 나타내었다.

$$\text{EDA}(\%) = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{시료무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

야관문 추출물의 superoxide anion radical 소거능 (superoxide anion scavenging activity, SSA)은 Na 등의 nitroblue tetrazolium(NBT) 환원방법(24)을 변형하여 측정하였다. 각 농도별 야관문 추출물 시료용액 0.1 mL에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 0.6 mL를 혼합 후, 0.4 mM xanthine(Sigma-Aldrich)과 0.24 mM NBT (Sigma-Aldrich)를 녹인 기질액 1 mL과 xanthine oxidase (0.049 U/mL) 1 mL를 가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 1 mL 1 N HCl을 가하여 반응을 정지시킨 다음 microplate reader로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정되어진 흡광도는 다음 식을 통해 superoxide anion radical 소거능을 나타내었다.

$$\text{SSA}(\%) = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{시료무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

실험동물 및 실험군

실험동물은 6주령 수컷(20~27 g) HR-1 hairless mouse (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan)를 분양받아 실험동물사 (온도 22.1±1°C, 상대습도 50±5%, 명암주기 12시간)에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험 전 기간 동안 사료와 물은 충분하게 공급하였다. 실험군은 Casagrande 등의 연구(25)를 참고하여 Table 2와 같이 5군으로 나누었으며, 각 군당 3마리씩 사용하여 실험하였다. 동물실험 수행에 관련된 모든 과정은 (재)대구테크노파크 바이오헬스 융합센터의 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)원칙을 준수하여 수행하였다.

Table 2. Experimental design of animals

Groups	Experimental group
NO	Non-UV treatment
CO	UV treatment
AB	UV treatment+vehicle
PCA	UV treatment+vehicle containing 0.2% ascorbic acid
AS	UV treatment+vehicle containing 0.2% <i>Lespedeza cuneata</i>

피부노화 유발 및 시료도포

각 실험군별 마우스들을 자외선 조사용 cage에 가둔 후

60 mJ/cm²의 UVB 광량을 1 minimum erythema dose(MED)로 하여 1주일 간격으로 1 MED씩 증가시켜 격일 간격으로 1주일에 3회, 5주 동안 배부에 조사하였으며, UVB 조사량은 UV-radiometer(LP9021, Delta OHM, Padua, Veneto, Italy)로 측정하였다. 5주간의 광노화 유발 후, Table 2와 같은 조건의 시료 200 mg씩을 5주간 1일 1회 배부에 도포하였다.

피부 홍반도 및 유수분 함량 측정

각 실험군별 마우스들의 피부 홍반도 측정은 Mexameter (MX18, CK electronic GmbH, Koin, Germany)를 사용하였고, 피부 유분과 수분함량은 Sebumeter(SM825, CK electronic GmbH)와 Corneometer(CM825, CK electronic GmbH)를 사용하여 비침습적 방법으로 시료 도포기간 동안 주 1회 측정하였다.

피부조직의 형태학적 관찰

각 시료 도포 후 5주째 되는 날 실험동물들을 에테르 마취하고 주름 정도의 객관적인 평가를 위하여 실험동물 배부에 실리콘폴리머(SILFLO impression material, Flexico, Tokyo, Japan)를 이용하여 피부 주형(replica)을 제작하였으며 skin visiometer(SV600, CK electronic GmbH)로 주름 형태를 관찰하고 주름관련 인자 수치를 확인하였다.

피부조직의 조직병리학적 관찰

5주간의 시료 도포 후 조직병리학적 검사를 위해 각 실험동물의 배부조직을 채취하여 10% 중성 formalin 용액에 24시간 동안 고정하였다. 고정된 조직은 피부전층을 포함하는 절편을 취하여 탈수시킨 후, paraffin 블록에 포매하여 조직절편기(RM2125, Leica, Wetzlar, Germany)로 4 µm 두께로 절단한 다음 polylysine으로 코팅된 slide에 붙여 사용하였다. 조직절편은 xylene을 이용하여 paraffin을 제거하고 알코올과 증류수로 10분 동안 함수시켜 증류수로 세척한 후, 피부조직의 변화 양상을 관찰하기 위하여 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색을 실시하였다. 또한 진피 내 교원질 섬유 형태를 관찰하기 위하여 Masson trichrome 염색을 하였으며, 피부손상 및 탄력정도는 Mucicarmine 염색을 통하여 관찰하였다.

피부조직내 항산화 효소활성 측정

피부조직 내 항산화효소 활성 측정을 위해 Biovision사가 제공하는 assay kit(BioVision Inc., Mountain View, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 제공된 방법에 준하여 SOD, GST 및 CAT 효소활성을 측정하였으며, 각 시험 항목에 사용된 피부 조직 마쇄액 내 단백질 함량을 BCA protein assay kit(Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA)를 사용하여 정량하고 protein(mg)당 각 효소활성으로 계산하여

결과를 나타내었다.

피부조직 내 유해 산화효소 활성 및 산화물질 생성 저해능 측정

피부조직 내 산화효소 활성 및 산화물질 함량 측정을 위하여 Biovision사가 제공하는 assay kit를 사용하여 xanthine oxidase(XO) 효소활성과 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 지질과산화물 함량을 측정하였으며, 각 시험 항목에 사용된 피부 조직 마쇄액 내 단백질 함량을 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하고 protein(mg)당 효소활성 및 함량으로 계산하여 결과를 나타내었다.

피부조직의 유전자 발현량 측정

각 실험동물들의 배부부위에서 채취한 조직은 RNAlater RNA Stabilization Reagent(Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany)를 사용하여 보관 후 본 실험에 이용하였다. RNeasy fibrous tissue mini kit(Qiagen)를 이용하여 각 조직으로부터 추출한 RNA 2 µg을 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific Inc., Walham, MA, USA)를 이용하여 cDNA 합성을 수행하였다. cDNA 0.5 µL, forward primer(10 pmole) 1 µL, reverse primer(10 pmole) 1 µL, SYBR Green supermix(Bio-rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) 12.5 µL, 멸균증류수 10 µL를 혼합하여 PCR 반응액을 준비하였으며, 사용된 PCR primer의 염기서열은 Table 3과 같다(26). Bio-Rad iCycler real time PCR system(IQ5 Real time PCR detection system, Bio-rad Laboratories Inc.)을 사용하여 RT-PCR반응을 수행하였으며, 각 실험군별 유전자들로부터 결과 되어지는 Ct(Threshold Cycle) 값에 근거한 GAPDH 유전자 대비 발현량을 백분율(%)로 나타내었다.

통계분석

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 반복 실험에 대한 평균값(mean)과 평균의 표준편차(SD)로 나타내었으며, 각 그룹간의 통계적 유의성은 SPSS(10.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one-way ANOVA 검정을 적용하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

식물 내 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로써 다양한 분자구조와 분자량에 의해 정의된 플라보노이드, 안토시아닌, phenolic acid 등 다양한 물질이 포함된다. 식물로부터 얻어지는 페놀성 화합물

은 안전한 천연 항산화제로써 알려져 있으며 이들이 가지는 phenolic hydroxyl(OH)기는 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하여 항산화, 항염증, 항암, 항균작용 등의 다양한 생리활성 기능을 나타냄으로써 자외선 노출, 질병, 상처 등이 유도하는 산화적 스트레스 및 생물학적 손상에 대한 방어 작용에 기여한다(23,24,26,27). 본 실험에 사용되어진 야관문 추출물의 생리활성물질 함량을 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 134.98 ± 1.70 mg/g으로 확인되었으며 총 플라보노이드 함량은 16.20 ± 0.05 mg/g으로 확인되었다. 본 결과는 Cho 등(18)이 야관문 잎 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드의 함량을 평가한 결과와 비교해 낮은 함량을 보였으나 이는 원료 및 추출 용매조건이 상이한 영향으로 여겨지며 본 실험에 사용되어진 야관문 추출물 역시 폴리페놀 및 플라보노이드 성분을 함유함으로써 유용한 생리 활성능을 나타내는 소재로써 사료된다.

Table 3. Oligo primer sequences of target genes for RT-PCR

Gene name	primer sequence
GAPDH	Forward 5'- GAG CCA AAC GGG TCA TCA -3'
	Reverse 5'- CAT ATT TCT CGT GGT TCA CAC C -3'
c-Jun	Forward 5'- GGC TAG ACT GCA GAT GAA CTC C -3'
	Reverse 5'- CAG TAA TCA GCT TTC ATC AAA TTA AAA -3'
c-Fos	Forward 5'- TTG CTG CTT CCA ACC TCA GT -3'
	Reverse 5'- AGC TTC TCA GCC CCT CTC TC -3'
p38	Forward 5'- TCG GAG CTT CCA TGA TTT CT -3'
	Reverse 5'- CTG AAT TCC ATC CCC ATG AT -3'
JNK	Forward 5'- AAC TGT TCC CCG ATG TGC T -3'
	Reverse 5'- TCT CTT GCC TGA CTG GCT TT -3'
PAK	Forward 5'- TGA CAA TAT TCT GCT GGG AAT G -3'
	Reverse 5'- TGC ACA GAA TCC AAA GTC AGT T -3'
MMP-3	Forward 5'- TTG TTC TTT GAT GCA GTC AGC -3'
	Reverse 5'- GAT TTG CGC CAA AAG TGC -3'
TNF-α	Forward 5'- AGT TCT ATG GCC CAG ACC CT -3'
	Reverse 5'- CGG ACT CCG CAA AGT CTA AG -3'

항산화 활성

과다한 자외선 노출에 의해 일어나는 피부조직 및 세포에서의 생물학적 반응을 통해 생성되는 활성산소는 세포막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질의 축적을 야기하며 피부 내 항산화 방어체계를 손상시킴으로써 염증반응, 색소침착, 노화를 비롯한 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다(29,30). 본 실험에 사용되어진 야관문 추출물이 함유하고 있는 생리활성물질이 가지는 항산화능을 평가하고자 활성산소로부터 생성되어 체내 유해활성을 나타내는 oxygen

free radical을 공여 및 소거할 수 있는 정도를 EDA와 SSA 측정을 통해 확인하였다(Table 4). 그 결과 야관문 추출물의 농도 의존적인 항산화능 효과를 확인하였으며, 0.05, 0.1 그리고 0.5 mg/mL 농도에서 각 항산화능 결과를 비교해 보았을 때 동일 농도조건에서 EDA에 의한 항산화효과 보다 SSA에 의한 항산화 효과가 각 5배, 3.5배, 1.5배 높음을 알 수 있었다. 전자공여능은 free radical에 전자를 공여하여 지질과산화 반응을 억제함으로써 항산화 작용에 기여하는 정도로 평가 할 수 있으며(31), 산화적 스트레스 반응에 의해 생성된 superoxide anion radical은 생체에 독성이 강하여 DNA 및 단백질 등 생체조직에 산화적 변성 및 손상을 유도함으로써 이 radical을 소거하는 정도 역시 항산화 작용에 기여하는 정도로 평가 될 수 있다(32). Kim과 Kim(16)은 야관문 종자의 열수 및 에탄올 추출물로부터 얻은 에탄올 분획물(10 µg/100 mL)의 전자공여능이 각각 39.5%, 95.3%로 높은 활성을 보이는 것으로 보고하였으며, Kim 등(17)은 야관문 메탄올 추출물과 용매 분획물이 가지는 SOD 유사 활성도를 보고한 바 있다. 본 실험에서 사용되어진 야관문 추출물도 전자공여능은 물론 특히 free radical 소거를 통한 항산화 작용이 우수한 항산화 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료되며, 자외선으로부터 유발되는 산화적 스트레스로부터 피부를 보호 및 개선하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

Table 4. Antioxidative activity of *Lespedeza cuneata* extract

Antioxidant ability	Concentration of samples (mg/mL)				
	0.05	0.1	0.5	0.75	1
EDA(%)	6.10±0.28	12.49±0.39	55.79±1.57	73.91±2.07	87.25±1.03
SSA(%)	30.87±4.28	41.96±1.39	80.23±4.42	85.47±4.15	87.49±6.11

^aData represent mean±SD of triplicate determination.

피부 홍반도 및 유수분 함량 변화

자외선에 과다노출 시 유도되는 산화적 스트레스에 의한 피부 손상은 각질층의 지질산화를 유발하면서 조직내 수분과 유분을 유지하려는 능력을 저하시킴으로써 피부는 건조해지고 주름이 증가하게 되고 결과적으로 노화가 촉진되게 된다(3,30,33). 또한 자외선 노출에 의해 임상적으로 관찰되는 피부손상은 혈관확장 및 일광화상 등에 의한 피부 홍반과 통증 및 소양증 등이 있으며(34,35), 홍반은 자외선 조사에 의해 심화된 염증반응과 histamine의 방출로 인한 혈류량 증가로 발생된다(36). 자외선 노출과 시료처리 후 실험동물 모델에서의 홍반과 유수분함량 변화 결과를 Table 5에 나타내었다. Jeon 등(36)의 연구에서 피부 광노화 유발을 위한 UVB 조사에 의해 홍반도가 증가된 바와 같이 본 연구에서도 UVB 조사만 이뤄진 대조군(CO)의 홍반도는 아무런 처

리를 하지 않은 정상군(NO)에 비해 42% 유의하게 증가하였다. UVB 조사 후 조성물 베이스 시료를 처리한 AB군과 UVB 조사 후 ascorbic acid가 첨가된 시료를 처리한 양성대조군(PCA)은 CO군에 비해 유의적으로 낮은 홍반도를 나타냈으며, 야관문 추출물이 첨가된 시료를 처리한 AS군 경우, CO군에 비해 홍반도가 유의적으로 28% 감소하여 정상군과 유사한 홍반도를 나타내었다. 이는 야관문 추출물이 UVB 조사에 의해 발생하는 피부 홍반을 개선하는데 효과가 있으며, 피부 홍반발생에 관여하는 염증반응을 경감시키는 것에 기여하고 있는 것으로도 생각되어진다. 각 실험군별 피부 유수분 함량 변화를 측정된 결과, NO군에 비해 CO군에서 수분은 약 51%, 유분은 약 76% 감소하였다. AB군과 PCA군은 CO군과 비교해 수분함량은 각각 65%, 79% 유의적으로 증가하였으며, 유분함량은 증가하는 경향은 보였으나 유의적이지는 않았다. AS군 역시 CO군에 비하여 수분함량은 유의적으로 약 131% 증가하여 정상군과 유사한 수준을 나타냈으며, 유분함량은 증가하는 경향은 보였으나 유의적이지는 않았다. 상기 결과를 통해 야관문 추출물이 UVB 조사에 의한 피부손상으로 발생된 홍반과 수분함량 손실에 빠른 개선효과를 나타내며 피부 광노화에 의한 피부손상을 개선 및 치유할 수 있는 제품개발 소재로서 적합한 것으로 사료된다.

Table 5. Changes in erythema index, moisture and lipid capacity of HR-1 hairless mouse skin after 5 weeks application of compounds

Groups	Erythema (AU) ¹⁾	Moisture (AU) ¹⁾	Lipid capacity (AU) ¹⁾
NO	143.15±18.79 ^c	41.21±3.40 ^{ab}	1.07±0.39 ^a
CO	203.81±13.56 ^a	20.07±2.00 ^d	0.26±0.17 ^b
AB	175.07±8.67 ^b	33.14±6.37 ^c	0.52±0.17 ^{ab}
PCA	172.44±12.31 ^b	35.88±3.33 ^{bc}	0.55±0.40 ^{ab}
AS	146.37±9.94 ^c	46.42±4.17 ^a	1.00±0.67 ^{ab}

^aValues are mean±SD of 3 mouse.

¹⁾AU: Arbitrary unit.

^{a-d}Values within a different superscripts letters are significantly different each other groups at a p<0.05.

피부조직의 형태학적 변화

자외선 노출에 의한 피부손상으로 피부는 건조해지고 탄력성이 감소되고 주름이 형성되어 외형적으로 관찰되는 피부노화가 일어나게 된다(37,38). UVB 조사 및 시료처리가 피부주름형성에 미친 영향을 형태학적으로 평가하기 위해 제작된 각 실험군의 피부주름형은 Fig. 1과 같다. NO군에 비해 CO군은 피부 표면에 굵고 깊은 주름이 형성된 것을 확인 할 수 있었으며, AB군은 CO군보다 가는 주름이 관찰되었으나 NO군에 비해서는 많은 주름이 형성된 것을 확인 할 수 있었다. PCA군과 AS군은 CO군에 비해 주름이

개선되었으며, 특히 AS군의 경우 NO군에 가까운 피부 형태가 관찰되었다. 수치적 피부주름 평가인자들을 비교 확인한 결과(Table 6), AB군, PCA군, AS군 모두 CO군과 비교하여 주름의 면적과 깊이가 감소하였으며, AS군의 경우 주름 면적과 깊이는 CO군에 비해 각각 약 75%, 46%로 감소되는 가장 큰 효과를 나타내었다. 또한, 주름형성 정도를 의미하는 mean form factor에서는 AS군이 유의적으로 정상군과 유사한 결과를 나타냈다. 상기 결과로 야관문 추출물이 자외선 노출에 의해 유발되는 주름형성 즉, 피부 광노화에 의한 미용적 피부손상에 대한 개선에 적합한 소재인 것으로 사료된다.

Table 6. Changes in wrinkle related factors of HR-1 hairless mouse skin after 5 weeks application of compounds

Groups	Total wrinkle area (mm ²)	Wrinkle depth (μm)	Mean form factor
NO	0.78±0.16 ^d	3889.13±565.95 ^d	0.74±0.02 ^a
CO	8.71±1.57 ^a	11359.59±98.90 ^a	0.60±0.02 ^c
AB	5.66±1.38 ^b	8029.61±977.86 ^b	0.64±0.03 ^{bc}
PCA	3.55±0.38 ^c	8261.60±788.62 ^b	0.67±0.02 ^b
AS	2.15±0.69 ^{cd}	6144.67±1105.25 ^c	0.75±0.05 ^a

^aValues are mean±SD of 3 mouse.

^{abcd}Values within a different superscripts letters are significantly different each other groups at a p<0.05.

피부조직의 조직병리학적 변화

자외선 노출은 활성산소종을 다량 생성하여 염증반응을 증가시켜 피부조직 구성성분의 불균형적 형성을 유발함으로써 피부구성 조직파괴와 각질층 증가 및 표피 비후화 등의 피부조직손상을 유발한다(30,39,40). H&E 및 Masson trichrome 그리고 Mucicarmine 조직염색을 통해 각 시험군의 조직병리학적 변화를 관찰하고자 하였다. H&E염색을 통해 관찰한 결과(Fig. 2A), NO군은 표피가 매끄럽고 진피층을 구성하는 조직배열이 규칙적으로 나타난 반면, CO군에서는 표피층이 NO군에 비해 비후해졌고 진피층 내 조직배열이 불규칙적이며 염증관련 세포의 출현이 관찰되었다.

AB군과 PCA군에서는 CO군에 비해 표피층의 비후와 염증 세포의 출현이 감소된 양상을 보였으며, AS군에서는 표피 및 진피의 손상이 거의 완화되어 NO군에 가까운 양상을 보였다. 진피층 내 콜라겐구성 조직 변화 양상을 Masson trichrome 염색으로 확인한 결과(Fig. 2B), NO군에서는 콜라겐 섬유가 규칙적으로 구성되어 있었으나 CO군을 비롯한 AB군과 PCA군에서 자외선 조사에 의한 콜라겐 조직의 파괴로 불규칙적인 배열을 나타내며 정상적인 조직형태를 이루지 못하였다. AS군에서는 NO에 가까운 콜라겐 섬유조직형성과 진피조직형태를 보임으로써 처리되었던 시료가 손상된 진피조직의 재생에 효과를 나타낸 것으로 확인되었다. 진피의 섬유성분과 세포들 사이에는 뮤신(mucin) 또는 점다당질(mucopolysaccharide)라고 불리는 세포의 물질이 수분 균형과 다른 조직 성분들을 지지하는데 도움을 주며 광노화에 의해 건조해진 피부에서 그 함량이 낮아진다고 보고된 바 있다(30). 상기 결과에서 야관문 추출물의 도포가 피부 수분 함량을 증가시킬 수 있음을 확인하였으며, 이러한 야관문 추출물의 보습 효과가 진피의 세포의 물질 함량 감소를 막음으로써 진피조직의 재생에 도움을 줄 수 있다. Mucicarmine 염색 결과(Fig. 2C), NO군에 비해 CO군과 AB군에서 조직 내 뮤신이 감소된 반면 PCA군과 AS군은 NO군과 유사한 정도의 뮤신 함유를 나타내었다. Nevia(41)은 현재 피부노화억제 및 개선에 잘 알려진 retinoid 라고도 불리는 vitamin A 유도체인 tretinoin이 피부 광노화에 대한 피부 재생효과에 있어서 항산화 작용(42) 외 muconous substance 증가에 도움을 준다는 긍정적 결과를 보고한 바 있으나 retinoid 피부염이라는 자극성 접촉피부염을 유발시키는 부작용을 나타낸다고 결과도 보고되고 있다(43). 상기 결과를 통해 야관문 추출물이 광노화로 인해 손상된 조직개선과 진피 내 수분함량과 조직구성에 기여하는 세포의 물질형성에 유익하게 작용함을 확인함으로써 피부노화 개선 효과에 기여할 수 있는 대체 천연소재로써 가능성을 확인하였다.

피부조직 내 항산화 효소활성

산화적 스트레스에 의해 생성된 활성산소에 의해 유도되

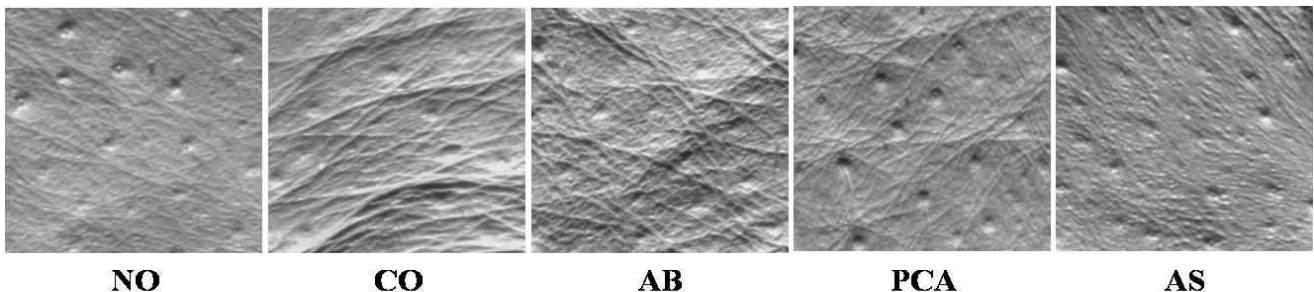


Fig. 1. Photographs of replica image of HR-1 hairless mouse skin after 5 weeks photoaging inhibition effect experiment.

NO, Normal group; CO, UV treated group; AB, UV+vehicle treated group; PCA, UV+vehicle containing 0.2% ascorbic acid treated group; AS, UV+vehicle containing 0.2% *Lespedeza cuneata* treated group.

Table 7. Skin superoxide dismutase, glutathione and catalase activities after 5 weeks application of compounds

Groups	SOD activity ¹⁾	GST activity ²⁾	CAT activity ³⁾
NO	18.17±0.09 ^a	17.12±0.51 ^b	1.00±0.09 ^a
CO	15.11±0.29 ^c	13.61±0.33 ^d	0.61±0.02 ^c
AB	16.54±0.46 ^b	14.42±0.50 ^d	0.75±0.02 ^b
PCA	15.31±0.84 ^c	15.60±0.25 ^c	0.72±0.10 ^{bc}
AS	18.21±0.51 ^a	18.42±1.12 ^a	0.93±0.01 ^a

^aNO, Normal group; CO, UV treated group; AB, UV+vehicle treated group; PCA, UV+vehicle containing 0.2% ascorbic acid treated group; AS, UV+vehicle containing 0.2% *Lespedeza cuneata* treated group.

¹⁾Values are mean±SD of 3 mouse.

²⁾Unit: inhibition rate (%)/protein (mg).

³⁾Unit: μmol (mmol/min/mL)/protein (mg).

⁴⁾Unit: mU/protein (mg).

^{a-d}Values within a different superscripts letters are significantly different each other groups at a p<0.05.

는 손상을 방어하기 위해 생체 내에서는 유해 산소화합물을 제거 및 분해를 위한 해독작용이 일어나며 SOD, CAT, GPX 및 GST 등과 같은 항산화 효소가 그 역할을 한다(44,45). 각 실험군의 피부 조직 내 산소 해독계 효소로써 알려진 SOD, GST 및 CAT 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 7과 같다. superoxide radical(O₂⁻)을 산소분자(O₂)와 과산화수소(H₂O₂)로 변환시켜 생체 내에 유독하게 작용하는 활성 산소를 제거해 주는 역할을 하는 SOD 활성측정 결과, CO군은 NO군 대비 약 17% 유의적으로 감소되었으며 CO군과 대비하여 AB군과 AS군에서는 SOD활성이 각 9.5%, 20.5% 유의적으로 증가하였고 AS군의 경우, NO군에 유사한 활성을 나타냈다. 대사과정 중 생성된 활성산소 및 친전자성물질은 glutathione과 함께 결합시켜 제거함으로써 항산화 기작을 나타내는 GST의 활성측정 결과, CO군은 NO군 대비 21% 정도 유의적으로 감소하였으며, CO군과 대비하여

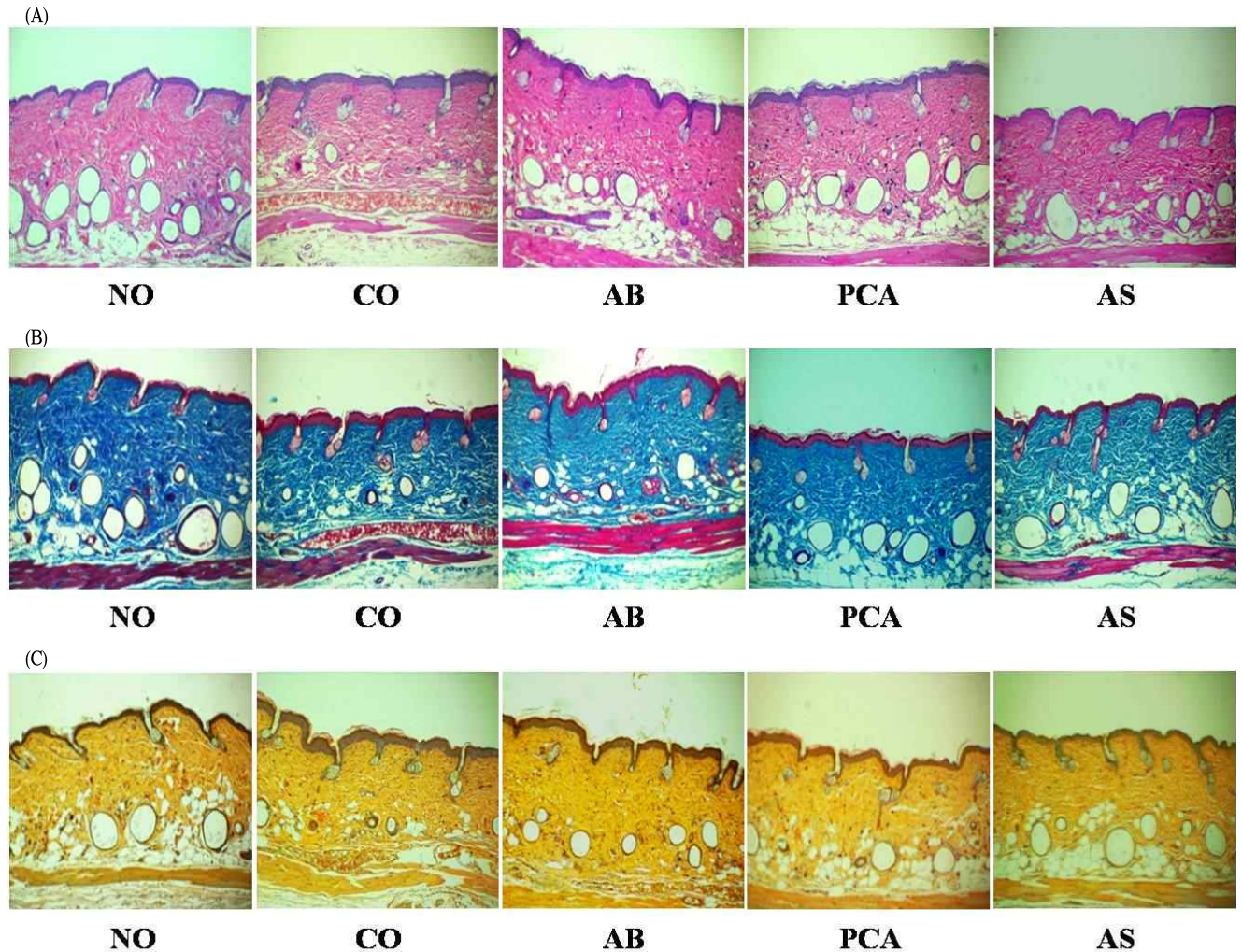


Fig. 2. Histological observation on HR-1 hairless mouse skin after 5 weeks experiment to evaluate the inhibitory effect of test compounds on photoaging.

A, Hematoxylin-Eosin stain; B, Masson trichrome stain; C, Mucicarmine stain. NO, Normal group; CO, UV treated group; AB, UV+vehicle treated group; PCA, UV+vehicle containing 0.2% ascorbic acid treated group; AS, UV+vehicle containing 0.2% *Lespedeza cuneata* treated group.

PCA군과 AS군은 각각 14.6%, 35.3% 유의하게 증가되었음을 확인하였으며 AS군의 경우 NO군보다 더욱 향상된 GST 활성을 보였다. Lee와 Song(46)은 한방 소재인 자초 추출물이 SOD 활성을 증가시켜 광노화를 억제시킨 효과를 보고하였다. 또한 Kim과 Kim(47)은 UVB로 손상된 피부에 상업과 상지 추출물을 도포 시 UVB 조사 되어진 대조군에 비해 SOD와 GST 활성이 증가됨을 확인하여 항산화 활성물질의 도포가 피부의 활성산소 소거에 효과가 있음을 보고하였다. 본 연구결과에서도 야관문 추출물의 생리활성물질에 의한 항산화 활성이 피부 조직에 영향을 주어 피부 조직 내 SOD와 GST 활성을 증가시키는데 기여한 것으로 사료된다. 산화적 스트레스에 의해 생성된 대사산물인 과산화수소를 물로 환원시키는 항산화 기작을 통해 생체 내 과산화적 손상방어에 관여하는 CAT 활성측정 결과, CO군은 NO군 대비 약 39% 정도 유의적으로 감소하였으며, CO군과 대비하여 AB군과 AS군에서는 각각 23%, 53% 유의적으로 증가하였고 AS군의 경우 NO군과 유사한 활성을 나타냈다. 이는 Lee 등(48)이 UVB 조사에 의해 손상된 CAT 활성이 탄닌 추출물 처리에 의해 유의적으로 증가한 보고와 일치하였다. 따라서 야관문 추출물은 자외선 노출에 의해 손상된 피부조직 내 산화방어기전인 항산화 효소활성을 개선 및 증가시킴으로써 유해 활성산소 제거에 도움을 주어 피부조직의 손상을 경감 및 개선시키는데 기여하는 것으로 사료된다.

피부조직 내 유해 산화효소 활성 및 산화물질 생성 저해능

XO는 생체에 존재하는 유해산소 생성계 효소로 superoxide anion radical 생성하며, UVB 조사에 의해 손상된 피부 조직에서 그 활성이 증가하며, 생성된 유해산소는 생체 내 지질과산화물 축적을 유발하여 조직 손상 및 노화를 초래한다(49-51). 따라서 XO 활성도 측정과 지질과산화물 함량 측정은 산화적 스트레스에 의한 생체 손상정도를 예상할 수 있게 한다. 각 실험군의 XO 활성과 지질과산화물 지표로 사용되는 TBARS 함량 측정 결과는 Table 8에 나타내었다. XO 활성측정 결과, CO군은 NO군 대비 약 36% 유의적으로 증가하였으나 AB군과 PCA군은 약 21% 그리고 AS군은 약 32%로 모두 CO군과 대비하여 유의적으로 감소된 활성을 나타내었다. TBARS 함량측정 결과, CO군은 NO군 대비 64%의 유의한 증가를 나타내었으며, AB군은 CO군 대비 약 13% 감소하였고 PCA군과 AS군은 CO군 대비 각각 36%, 33%의 유의적인 감소를 나타내며 NO군 조직 내 지질과산화물 함량과 유사하였다. 이는 Kim 등(20)의 자외선 노출로 유발된 피부 광노화를 억제하기 위한 야관문 에탄올 추출물 도포 시 농도 의존적으로 XO 활성과 TBARS 함량이 유의적으로 감소하였다는 보고와 일치하였다. 이상의 결과를 토대로 화장품 조성물 내 함유된 야관문 추출물이 자외선 노출에 의해 발생되어 피부조직손상에 관여하는

산화효소 활성과 지질과산화물 형성을 저해 및 제거하는데 도움을 주어 피부 광노화를 개선할 수 있는 효능을 가지는 제품소재로써 개발이 가능할 것으로 사료된다.

Table 8. Skin xanthine oxidase activity and thiobarbituric acid tractive substance contents after 5 weeks application of compounds

Groups	XO activity ¹⁾	TBARS contents ²⁾
NO	0.14±0.01 ^{bc}	0.55±0.04 ^c
CO	0.19±0.01 ^a	0.90±0.04 ^a
AB	0.15±0.01 ^b	0.78±0.04 ^b
PCA	0.15±0.01 ^b	0.57±0.05 ^c
AS	0.13±0.01 ^c	0.60±0.06 ^c

^aNO, Normal group; Co, UV treated group; AB, UV+vehicle treated group; PCA, UV+vehicle containing 0.2% ascorbic acid treated group; AS, UV+vehicle containing 0.2% *Lespedeza cuneata* treated group.

^bValues are mean±SD of 3 mouse.

¹⁾Unit: mU/protein (mg).

²⁾Unit: nmol/protein (mg).

^{a-c}Values within a different superscripts letters are significantly different each other groups at a p<0.05.

피부조직의 유전자 발현량 변화

자외선 노출은 세포 성장인자 및 수용체들을 활성화시켜 extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-jun amino-terminal kinase(JNK), p38등의 MAPKs(mitogen activated protein kinase) 신호전달체계를 활성화하여 피부손상을 유도한다(52). JNK와 p38은 c-Jun 단백질 활성을 자극하여 c-Jun과 c-Fos 단백질로 이뤄진 전사인자인 AP-1 복합단백질을 활성화 시켜 교원질 섬유를 분해시키는 MMPs의 활성을 자극함으로써 피부조직 손상을 통한 주름생성을 촉진하며, p21-activated kinase(PAK)가 MAPK 인산화에 관여하여 신호자극정도를 조절한다(26). 특히 MMPs 중 MMP-3는 자외선 노출에 의해 발현이 증가되어 교원질 및 proteoglycan, fibronectin과 같은 여러 종류의 기질단백질을 분해하여 주름을 생성시킨다(52,53). 또한 피부의 자외선 노출은 산화적 스트레스를 유발하여 전염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 발현 증가를 유도하는 것으로 알려져 있다(30,54). 따라서 본 연구에서는 야관문 추출물이 피부 광노화에 의해 유도되는 유전자들의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다(Fig. 3). MAPKs의 인산화효소로 작용하는 PAK 유전자 발현에서 CO군은 NO군에 비해 유의적으로 약 20% 증가하였으며, PCA군과 AS군은 CO군 대비 각각 6%, 16%로 유의적인 유전자 발현 감소 결과를 나타내었고 AS군의 경우 NO군과 유사한 PAK 유전자 발현정도를 나타내었다. p38 유전자 발현은 NO군 대비 CO군이 약 16% 증가하였으며, AB군, PCA군 그리고 AS군은 각각 CO군과 대비하여 약 5%, 9%, 11% 유의적으로 유전자 발현 감소 결과를 나타내었다. Chung 등(55)은 젊은층과 노인층들을 대상으로 피부 조직을 생검하여 유전자 발현을 조사한 결

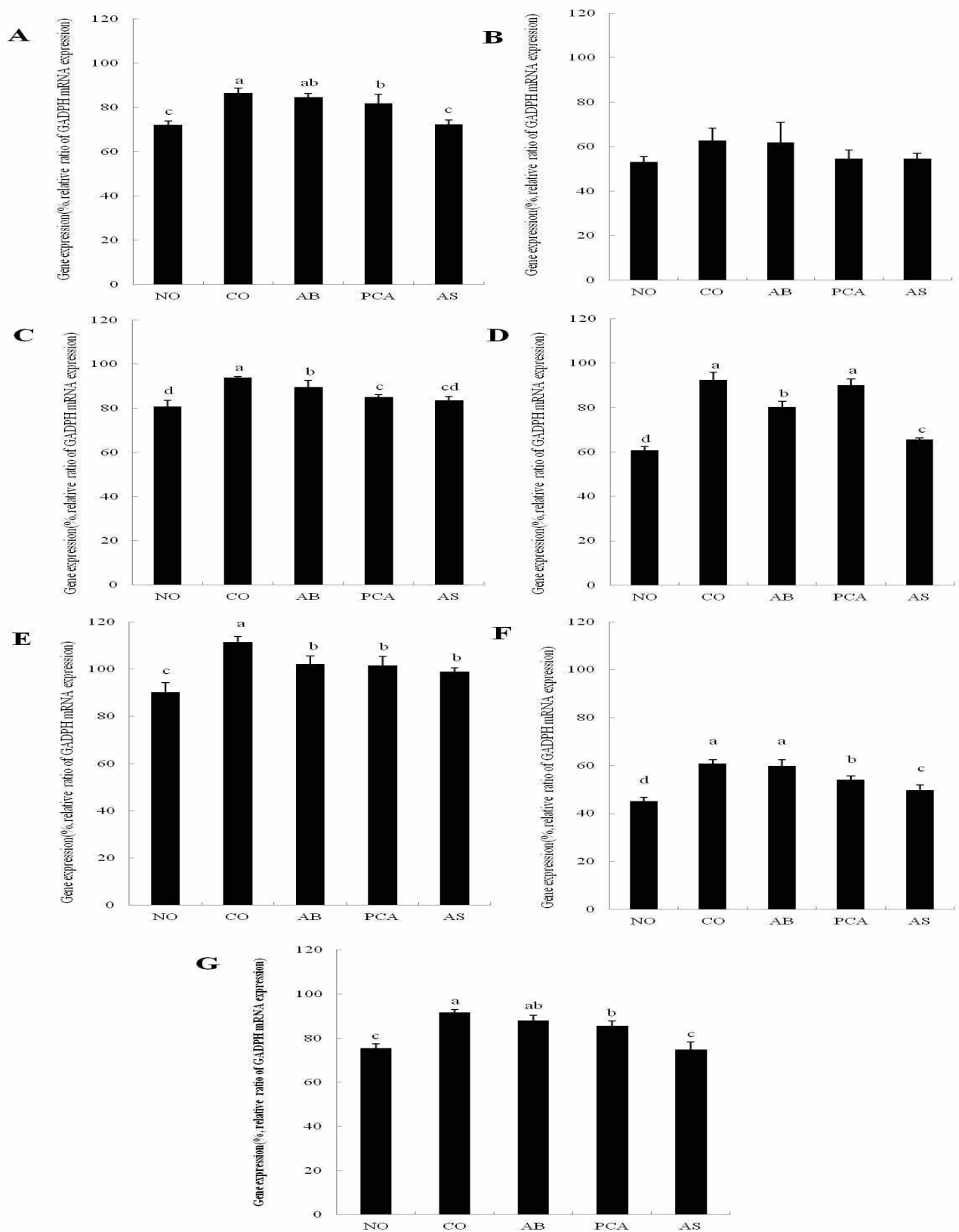


Fig. 3. Comparison in gene expression level of HR-1 hairless mouse skin after 5 weeks application of test compounds.

A, PAK; B, JNK; C, p38; D, c-Fos; E, c-Jun; F, TNF- α ; G, MMP-3. NO, Normal group; CO, UV treated group; AB, UV+vehicle treated group; PCA, UV+vehicle containing 0.2% ascorbic acid treated group; AS, UV+vehicle containing 0.2% *Lespedeza cuneata* treated group. The values are mean \pm SD of 3 mouse. The values within a different superscripts letters are significantly different each other groups at a p<0.05.

과, 노인층에서 p38 유전자 발현이 증가되어 있음을 보고한 바 있다. 따라서 야관문 추출물에 의한 p38 유전자 발현의 감소는 야관문 추출물이 피부노화 개선에 효과가 있음을 분자 생물학 수준에서 보여준다. 자외선 노출에 의해 활성화되는 전사인자로 알려진 AP-1 복합체를 구성하는 c-Fos와 c-Jun 유전자 발현을 조사한 결과, AS군에서 CO군 대비 c-Fos 유전자 및 c-Jun 유전자 발현은 각각 29%, 11%로 유의적으로 감소하였다. 자외선 노출에 의해 피부조직을 구성하는 세포들이 분비하는 사이토카인들의 종류와 그 양은 조직손상과 치유에 중요한 의미를 지니며 이들 중 전염증상 사이토카인인 TNF- α 는 MMPs의 발현을 증가시켜 주름생성을 유도한다(56). 각 시험군의 피부조직 내 TNF- α 유전자 발현은 NO군 대비 CO군이 약 35% 증가하였으며, PCA군과 AS군은 각각 CO군과 대비하여 약 11%, 18% 유의적으로 유전자 발현이 감소된 결과를 나타내었다. So 등(26)은 피부 주름 개선을 위해 개발한 홍삼 생약 복합물에 의해 c-Fos, c-Jun 그리고 TNF- α 발현이 농도 의존적으로 감소함을 보고한 바 있으며, 야관문 추출물도 이들 유전자 발현 감소시킴으로 피부 주름개선에 효과를 일으키는 것으로 사료된다. 피부손상 및 주름형성에 직접 관여하는 MMP-3 유전자의 발현은 Lee 등(57)의 보고와 같이 자외선 조사에 의해 MMP-3 유전자 발현은 증가되었으며, AS군의 경우 NO군과 유사하게 CO군 대비 18%로 유의적인 유전자 발현 감소결과를 나타내었다. 따라서 자외선에 노출된 피부조직에 야관문 추출물의 도포는 p38과 PAK 유전자 발현을 감소시키고 c-Jun 활성을 낮추어 MMP-3 분비를 감소시킬 수 있으며 앞서 확인된 결과에서의 자외선 조사에 손상된 피부 조직의 형태학적 및 조직학적인 회복은 야관문 추출물에 의한 MMP-3 유전자 발현 감소에 의한 것으로 사료된다. 야관문 추출물은 항산화성 생리활성물질 함유를 통해 자외선에 노출되어진 피부조직 내에서 산화적 스트레스를 방어 할 뿐만 아니라 피부 광노화로 인해 유도되는 신호전달 및 염증반응과 교원질 손상에 관여하는 유전자들의 발현을 억제 및 감소에 도움을 줌으로써 자외선 조사에 의해 손상된 피부조직 개선에 분자적 수준에서부터 형태학적 수준까지 유효성을 가지는 소재임을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 화장품 조성물 내에 함유된 야관문 추출물의 자외선 조사에 의한 피부 광노화를 억제 및 개선할 수 있는 효능을 조사하였다. 야관문 추출물 내 총 폴리페놀 함량은 134.98 ± 1.70 mg/g, 총 플라보노이드 함량은 16.20 ± 0.05 mg/g 으로 정량되었다. 야관문 추출물은 농도 의존적으로 전자공여능 및 자유라디칼 소거능에 의한 항산화 활성을 나타내는 것을 확인하였으며 동일 농도조건에서

전자공여능 보다 자유라디칼 소거능에 의한 항산화력이 더욱 높았다. 피부 홍반도는 대조군(CO)에 비하여 야관문 추출물이 함유된 시료를 도포한 시험군(AS)에서 28%의 홍반도 감소 효과를 보였으며, 피부 수분함량은 AS군에서 CO군과 비교하여 유의하게 증가하였다. 피부주형의 형태학적 관찰을 통해 AS군에서 피부의 주름 면적과 깊이가 현저하게 감소하였음을 확인하였으며, 조직염색을 통해 AS군에서 자외선 조사에 의해 손상된 피부조직이 정상적인 피부구성 조직과 유사하게 재생되었음을 확인하였다. 피부조직 내 유해산소 해독계 효소들인 SOD, GST와 CAT 활성은 CO군과 비교해 AS군에서 유의적인 증가를 보였으며, 유해산소 생성계 효소 XO와 지질과산화물 함량은 유의하게 감소하였다. 자외선 노출에 의해 발현이 유도되는 PAK, p38, c-Fos, c-Jun, TNF- α , MMP-3 유전자들은 CO군 대비 AS군에서 그 발현이 유의하게 감소함을 확인하였다. 이와 같은 결과는 야관문 추출물은 항산화능을 나타내는 생리활성물질의 작용을 통해 피부 광노화에 의한 피부손상과 주름형성을 개선하는데 분자적 수준에서 형태학적 수준까지 효능을 나타내어 피부 광노화억제 및 개선 제품으로 활용이 가능 할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부의 지역산업기술개발사업(과제번호: A000200004)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Kim EJ, Ahn SY, Nam GW, Lee HK, Moon SJ, Kim YM, Oh MS, Kim MS, Chang IS, Park SK (2006) The anti-aging effects of the cosmetic products containing the needle of red pine on human skin. *Korean J Herbology*, 21, 25-31
2. Kim YJ, Lee YR, Cheon JW, Lee HS (2010) Anti-aging effect of *Ligustrum japonicum* extract in the human fibroblasts cells. *J Soc Cosmet Scientists Korea*, 36, 295-301
3. Lim AK, Jung YJ, Kim KS, Kim YH, Kwak JH, Hong JH, Kim HY, Kim DI (2010) Skin UVB photo aging effect from extract of fermented *reynoutria elliptica*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39, 369-375
4. Miyachi Y (1995) Photoaging from an oxidative standpoint. *J Dermatol Sci*, 9, 79-86
5. Lavker RM, Kwong F, Kligman AM (1980) Changes

- in skin surface patterns with age. *J Gerontol*, 35, 348-354
6. Masamitsu I (2009) Photoaging of skin. *Anti-Aging Medicine*, 6, 46-59
 7. Wu CL, Chou HC, Cheng CS, Li JM, Lin ST, Chen YW, Chan HL (2012) Proteomic analysis of UVB-induced protein expression- and redox-dependent changes in skin fibroblasts using lysine-and cysteine-labeling two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteomics*, 75, 1991-2014
 8. Darr D, Fridovich I (1994) Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol*, 102, 671-675
 9. Hassan HM (1988) Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med*, 5, 377-384
 10. Borek C (2004) Dietary antioxidants and human cancer. *Integr Cancer Ther*, 3, 333-341
 11. Park JY, Hwang JG, Yun JK, Han KH, Do EJ, Kim SO, Kim MR (2012) Effect of ssanghwa-tang extract on antioxidant and anti-aging enzyme activities. *Kor J Herbology*, 27, 67-74
 12. Kim OK (2009) Antioxidative effect of *Polygoni radix* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Pharmacogn*, 40, 213-217
 13. Jang MJ, Cheon SJ, Kim HY, Kwoen DJ, Kim HY, Kim SH, Lee JT (2011) The anti-wrinkle and whitening effect of *Casranea crenata* inner shell. *J Life Sci*, 21, 734-738
 14. Kang KS, Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Oh SH, Kim MA, Jung HJ, Kang HY, Ha BJ (2007) The evaluation of anti-wrinkle effects in oriental herb extract. *J Life Sci*, 17, 1147-1151
 15. Lee HJ, Lim GN, Park MA, Park SN (2011) Antibacterial and antioxidative activity *Lespedeza cuneata* g. don extracts. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 39, 63-69
 16. Kim SJ, Kim DW (2007) Antioxidative activity of hot water and ethanol extracts of *Lespedeza cuneata* seeds. *Korean J Food Preserv*, 14, 332-335
 17. Kim HY, Ko JY, Song SB, Kim JI, Seo HI, Lee JS, Kwak DY, Jung TW, Kim KY, Oh IS, Jeong HS, Woo KS (2012) Antioxidant and a-glucosidase inhibition activities of solvent fractions from methanolic extract of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata* g. don). *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 1508-1514
 18. Cho EJ, Ju HM, Jeong CH, Eom SH, Heo HJ, Kim DO (2011) Effect of phenolic extract of dry leaves of *Lespedeza cuneata* g. don on antioxidant capacity and tyrosinase inhibition. *Korean J Hort Sci Technol*, 29, 358-365
 19. Ding JL, Kim IJ, Lee HD, Cha WS (2006) Analysis of minerals, amino acids and vitamin of *Lespedeza cuneata*. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 21, 414-417
 20. Kim HJ, Kim KS, Kim DI (2012) Inhibitory effects of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on ultraviolet-induced photo aging. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 1540-1545
 21. Min SH (2006) Quality characteristics of doenjang containing *Astragalus membranaceus* water extracts. *Korean J Food Cookery Sci*, 22, 514-520
 22. Jia Z, Tang M, Wu J (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555-559
 23. Yoon SR, Lee MH, Kim HK, Lee GD (2006) Change in functional properties by extraction condition of roasted *Pleurotus eryngii*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 35, 262-270
 24. Na GS, Lee SK, Kim SY (2007) Antioxidative effects and quality characteristics of the rice cultivated by organic farming and ordinary farming. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 50, 36-41
 25. Casagrande R, Georgetti SR, Verri JWA, Dorta DJ, Santos ACD, Fonseca MJ (2006) Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J Photochem Photobiol B*, 84, 21-27
 26. So SH, Lee SK, Hwang EI, Koo BS, Han GH, Lee MJ, Chung JH, Lee MJ, Kim NM (2008) Mechanisms of Korean red ginseng and herb extracts (KTNG0345) for anti-wrinkle activity. *J Gineng Res*, 32, 39-47
 27. Yordi EG, Perez EM, Matos MJ, Villares EU (2012) Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. Nutrition, well-being and health. Jaouad Bouayed, Torsten Bohn (Editor), In Tech, Rijeka, Croatia, p 23-48
 28. Dimitrios B (2006) Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol*, 17, 505-512
 29. Jung HY (1991) Aging, free radical, arteriosclerosis. *Life Sci*, 1, 2-14
 30. Yaar M, Gilchrest BA (2007) Photoaging: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol*, 157, 874-887
 31. Hah DS, Kim CH, Kim GS, Kim EG, Kim JS (2005) Antioxidative effects of traditional medicinal plants on lipid peroxidation. *Korean J Vet Res*, 45, 341-350
 32. Kanatt SR, Chander R, Sharma A (2007) Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem*, 100, 451-458
 33. Bae KH, Choe TB (2007) A study on factors affecting the creation of wrinkles in middle-aged women. *J Korean*

Soc Cosm, 13, 976-988

34. Soter NA (1990) Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. *Semin Dermatol*, 9, 11-15
35. Pathak MA (1982) Sunscreens: topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation. *J Am Acad Dermatol*, 7, 285-312
36. Pathak MA, Kramer DM, Gungerich U (1972) Formation of thymine dimers in mammalian skin by ultraviolet radiation *in vivo*. *Photochem Photobiol*, 15, 177-185
37. Jeon TRS, Choi SY, Kim YC, Chang BS (2011) Improving effects of black tea water extract on skin aging. *J Invest Cosmet*, 7, 441-447
38. Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM (1982) Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *J Invest Dermatol*, 78, 181-189
39. Chiba K, Kawakami K, Sone T, Onoue M (2003) Characteristics of skin wrinkling and dermal changes induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to hairless mouse skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 16, 242-251
40. Bae IS, Shim MJ, Kim YC (2011) Anti-inflammation effects of *phellodendrin cortex* water extract application in photo-aged hairless mice. *J Biomed Res*, 12, 205-214
41. Nevia DL (2010) Local therapy as basic anti-aging prevention. *Acta Clin Croat*, 49, 529-536
42. Weiss JS, Ellis CN, Headington JT, Voorhees JJ (1988) Topical tretinoin in the treatment of aging skin. *J Am Acad Dermatol*, 19, 169-175
43. Fisher GJ, Esmann J, Griffiths CE, Talwar HS, Duell EA, Hammerberg C, Elder JT, Finkel LJ, Karabin GD, Nickoloff BJ (1991) Cellular, immunologic and biochemical characterization of topical retinoic acid-treated human skin. *J Invest Dermatol*, 96, 699-707
44. Lee SJ, Kim YC (2006) A study on the oxidative damage induced by UVB irradiation to mouse skin. *J Environ Toxicol*, 21, 165-172
45. Miyachi Y, Imamura S, Niwa Y (1987) Decreased skin superoxide dismutase activity by a single exposure of ultraviolet radiation is reduced by liposomal superoxide dismutase pretreatment. *J Invest Dermatol*, 89, 111-112
46. Lee HH, Song SY (2010) A study of effectiveness of *lithospermum erythrorhizon* extracts on the skin by UVB-irradiation C57BL6 mouse. *Korean J Microscopy*, 40, 139-145
47. Kim JS, Kim JB (2011) The effects of extracts from mulberry (*morus alba*) leaves and branches on UVB-induced skin damage. *J Korean Soc Cosm*, 17, 993-999
48. Lee MK, Lee SY, Ahn HS, Ahn RM (1996) Lipid peroxidation and antioxidase activities on hairless mouse induced by UVB irradiation and effects of tannic acid. *Korean J Env Hlth Soc*, 22, 102-108
49. Michael J IM, Paul NM, Gregory BB, John EH (1985) Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg*, 201, 357-359
50. Choi OS, Kwon MH, Kong MK, Lee SH, Gang SR, Kim PS, Kim YC (2008) Inhibition effects of frankincense oil skin aging(II): focused on histological observation. *J Environ Toxicol*, 23, 129-138
51. Rodríguez-Martínez M, García-Cohen EC, Briones A, Baena AB, Marín E, Salaices M, Marín J (1999) Changes in plasma oxidative state with age and their influence on contractions elicited by noradrenaline in the rat tail artery. *Life Sci*, 65, 915-924
52. Brenneisen P, Sies H, Kochanek KS (2002) Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases from induction via signaling to initial events. *Ann NY Acad Sci*, 937, 31-43
53. Shinji I, Yukiko M, Satoshi A, Keiko T, Kouji K, Makoto T, Toshio N, Yoshiyuki K, Minoru F (2003) Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *J Invest Dermatol*, 120, 1-7
54. Lee JH, Lee SH, Youn HJ, Kim JE, Cho KH (2006) Cytokine expression in infrared and ultraviolet irradiated artificial skin. *Korean J Invest Dermatol*, 13, 35-42
55. Chung JH, Kang SW, Varani J, Lin J, Fisher GJ, Voorhees JJ (2000) Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol*, 115, 177-182
56. Mauviel A (1993) Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem*, 53, 288-295
57. Lee KO, Kim YC, Chang BS (2011) Improving effects of white tea water extract on skin wrinkle induced by UVB irradiation in hairless mice. *J Invest Cosmet*, 7, 349-357