

피부노화의 지표가 되는 collagen과 malonedialdehyde의 정량적인 변화

김기영[†] · 이재형^{**} · 진주영^{*} · 양시용^{*}

[†]원광대학교 의과대학 병리학교실, ^{*}한의학전문대학원, ^{**}원광보건대학 물리치료학과

Quantitative Changes of Collagen and Malonedialdehyde as the Parameters of Skin Alteration

Ki Young Kim[†], Jae Hyung Lee^{**}, Ju Young Jin^{*}, and Si Yong Yang^{*}

Department of Pathology, Medical School and ^{*}Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 344-2, Shinyong-dong, Iksan-si, Cheonbuk 570-749, Korea

^{**}Department of Physical Therapy, Wonkwang Health Science College, Iksan, Korea

요약: 피부 노화를 예방할 수 있는 기능성 화장품은 지질과산화물을 초래하는 활성산소종(ROS)의 생성 억제와 제거 또는 collagen과 elastin의 사슬 절단 및 교차결합의 변형을 억제하는 효능이 있어야 한다. 본 연구에서는 피부 조직 중 malonedialdehyde (MDA)와 collagen이 항노화 작용이 있는 기능성 화장품의 검색 지표로서의 사용 가능성을 알아보하고자 10, 25 주령 랫드의 정상 피부와 창상을 유도한 피부를 7일간 관찰하였다. 육안적인 관찰에서는 10 주령군의 11마리 랫드 중 10마리에서, 노령 랫드군의 11마리 중 8마리에서 창상이 폐쇄되었다. 10 주령 랫드와 비교했을 때 노령 랫드에서 흉터의 길이는 긴 반면에 외피의 폐쇄, collagen 밀도, 외피의 두께, 총 hydroxyproline (hyp)과 MDA 농도가 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05 \sim p < 0.005$). 10 주령에서 진피의 규칙적으로 배열된 collagen 섬유다발과 많은 섬유아세포의 관찰과는 반대로 25 주령 이상 랫드에서는 collagen 섬유다발 사이에 많은 낭포, 소와 및 섬유아세포 수의 감소, 느슨한 외피와 진피의 결합과 얇은 외피가 관찰됨으로서 25 주령 이상의 랫드에서 감소된 hyp 양은 감소된 collagen 밀도 및 형태학적 변화와 일치하였다. 따라서 collagen 합성과 축적의 지표인 hyp의 측정은 항 피부노화 예방 및 개선제의 모니터링 연구에서 매우 유용하며 또한 피부 노화의 검색 지표로 사용이 가능하다고 사료된다.

Abstract: Anti-skin aging agent could be have an inhibition effect of ROS production as well as fragmentation and change of collagen cross linkage in collagen molecule. For the monitoring of lipid peroxidation and collagen degradation, the skin of young and old rats were incised and observed 7 days. In the result, the wound closure was observed in the skin from 10 of 11 young rats and in 8 of 11 old rats. And the longer wound length but shorter wound closure, weaker collagen density and thicker epidermis were observed in old rats than in young rats. The level of hydroxyproline as a parameter of collagen synthesis and MDA as a parameter of lipid peroxidation was lower in old group than in young group. The cyst and lacuna between collagen bundle and fibroblast were observed in old rats in contrast to young rats. So that we propose that MDA and hydroxyproline could be used for monitoring of anti-skin aging agent

Keywords: alteration, antioxidant, malonedialdehyde, collagen, hydroxyproline

1. 서 론

21세기 고령화 사회로의 진입에 따른 시대적 요구와 아울러 젊고 탄력적인 피부를 원하는 여성들의 수적인 증가로 화장품업계에서 유효성과 안전성이 뛰어난 새로운 기능성 화장품, 특히 피부의 주름개선을 포함한 노화 방지용 화장품에 대한 연구 개발이 활발히 진행되고 있

다[1,2]. 기능성 화장품은 지질과산화물을 초래하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 억제하거나 생성된 free radical을 제거할 수 있어야 하며 collagen과 elastin의 사슬 절단과 교차결합의 변형을 억제 할 수 있어야 한다.

최근에 이러한 효능이 있는 새로운 기능성 화장품의 개발에 대한 요구는 기존의 의약품 개발에 이용되어 오던 생명공학 등을 이용한 기술의 발전과 함께 천연물질인 식물성 오일, 종자류 약재, 여러 가지 한방 약재에서

[†] 주 저자 (e-mail: kkyoung@wonkwang.ac.kr)

collagen과 elastin을 분해하는 collagenase 및 elastinase의 활성억제, 항산화 효과가 있는 물질 등에 관한 많은 보고가 있다[3-7].

피부 노화의 특성으로는 탄력성(탄성: elasticity)의 감소, 주름살, 기미 또는 주근깨 등을 들 수 있고, 그 원인 중의 하나는 지질과산화에 의한 탄력섬유인 collagen과 elastin의 사슬 절단과 비정상적인 교차결합 및 hyaluronic acid의 사슬 절단이다. 지질과산화는 oxidative stress에 의해서 초래되며, 그 과정 중에서 ROS인 free-radical (superoxide, hydroxy radical, nitric oxide)이 생성된다. 이러한 free radical 생성과정은 피부에 유해한 대사적 활성화의 전 단계일 뿐만 아니라, 피부 세포 및 조직 손상을 일으킨다고 보고되었다[8,9]. 또한 지질과산화산물인 MDA (malonedialdehyde)와 4-hydroxynonenal은 항노화 및 주름 개선제(anti-wrinkle agent)의 개발 시에 피부 노화의 지표물질로서 사용되고 있다[10,11].

탄력 섬유인 collagen은 elastin과 함께 망상으로 존재하며 털을 세워주는 기모근과 함께 진피를 지지하고 있다. 지금까지 collagen은 19가지 아형이 알려져 있고, 1,500개의 아미노산으로 구성된 α -chain을 가지는 동종(homo-), 또는 이종(hetero) 삼중나선(triple helix) 구조를 형성한다[12]. 특히 진피 중에는 collagen type I, III, IV, V가 가장 많고, type V는 type I과 III의 anchor collagen으로 알려져 있으며, type I과 III는 hybrid 형태로 존재한다[11]. 이러한 collagen은 많은 섬유아세포(fibroblast)에 의해 생성되며 ECM (extracellular matrix)의 70~80%를 차지하고, 2~4%의 elastin을 비롯하여 glycosaminoglycans, 당단백 등과 함께 ECM을 구성한다. Hyp (hydroxyproline)은 collagen을 구성하는 아미노산이며, 총 아미노산의 10~12%를 차지하기 때문에 피부 뿐만 아니라 간, 심장 등에서 collagen의 합성과 축적의 지표물질로서 알려져 있다[10,13]. Collagen의 대사 이상은 피부에서 켈로이드, 기저막 파괴에 의한 건선(psoriasis), 수포성 표피 박리증(epidermolysis bullosa) 등의 질환으로 나타난다.

이러한 이유에서 지질과산화의 지표 물질인 MDA와 collagen 합성 및 축적 지표인 hyp의 측정은 피부 노화 대사기전, 창상의 기전 연구와 항노화 예방 및 개선제의 개발 시에 유용하게 사용되고 있으나, 두 가지 지표는 각기 독립적으로 사용되었을 뿐 만 아니라 기초적인 자료 역시 많지 않다[14,15].

따라서 본 연구에서는 일차적으로 항노화 기능성 화장품 품과 피부 노화의 알아 볼 수 있는 검색지표를 찾고자 어린 랫드와 노화된 랫드의 정상 피부와 창상을 유도한 피부에서 창상의 회복, 창상 폐쇄의 크기와 길이, 외피의 두께, collagen과 MDA의 측정 및 조직학적 변화를 관찰하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 실험동물

10 주령의 랫드와 25 주령 이상(노령)의 랫드 11마리씩을 한군으로 설정하였고, 2~3마리의 랫드를 cage에 넣어 사육하였다. 물과 사료를 자유롭게 공급하였고, 밤과 낮의 리듬을 구분하여 주었다.

2.2. 피부 창상유도 및 일반적인 관찰

랫드를 rompun과 ketamine 혼합액 0.7 mL을 복강주사하여 마취시켜서 배부 좌우에 1 cm의 창상을 유도하였고, 유도 전과 유도 7일 후의 체중을 측정하였으며 5일, 7일간 관찰하였다. 그 후에 10 주령 랫드군과 25 주령 이상 랫드군에서 치유 후 흉터의 크기와 폐쇄된 부위를 측정하여 서로 비교하였다.

2.3. 실험재료의 채취

배부 피부 조직의 일부는 hydroxyproline과 malonedialdehyde의 측정을 위하여 -70°C 에서 보관하였으며, 나머지 피부조직은 10% 중성 포르말린에 고정하여 hematoxylin & eosin, Masson's trichrome 염색에 사용하였다.

2.4. 총 collagen 양 측정

피부 조직내 hyp 양의 측정은 Jamall과 Finelli[16]의 방법을 사용하였다. 피부 조직 0.05 g을 평량하여 4 mL의 6 N HCl을 넣고 110에서 12시간 이상 가수분해시킨 후에 50 μL 를 취하여 시료로 사용하였다. 표준 물질로는 4-trans hydroxyproline을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 로 희석하였다. 가수분해시킨 시료와 희석한 표준 물질에 500 μL 의 50% isopropylalcohol을 넣고 다시 200 μL 의 chloramine-T 용액을 넣어 산화시킨 후에 1.0 mL의 ehrlich's reagent solution (p-dimethylamino-benzaldehyde)을 넣고 50°C 에서 90분간 발색시켜서 550 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

2.5. MDA (malonedialdehyde) 측정

Okawa 등[17]의 방법을 사용하였다. 피부 조직 시료 0.05 g에 1.95 mL 1.15% KCl을 넣고 균질화 시킨 후에 상등액을 사용하였다. 표준물질로는 tetramethoxypropane을 1, 2, 4, 6, 8, 19 nmol/200 μL 1.15% KCl로 희석하였다. 균질화 시킨 시료와 희석한 표준물질 각 200 μL 에 0.2% SDS 200 μL 를 가하고 혼합하여 10분간 실온에서 방치한 후에 20% acetic acid 1.5 mL, 0.8% thiobarbiturate 1.5 mL과 3차 증류수 600 μL 를 가하여 95°C 에서 30분간 반응시킨 후 얼음에 넣어 냉각시켰다. 그런 다음 2 mL butanol을 가하고 혼합 한 후에 3,000 rpm에서 5

분간 원심분리하여 532 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

2.6. 조직염색

2.6.1. Hematoxylin & eosin (H&E)

Paraffin으로 embedding한 조직을 5 μm로 절단하여 xylene과 alcohol로 paraffin을 제거하였다. Hematoxylin으로 5분간 염색하여 암모니아수와 물로 씻고 eosin으로 1분간 염색하여 alcohol로 씻고 xylen으로 탈수시켜 Canada balsam을 넣고 봉입하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

2.6.2. Masson's trichrome

5 μm로 절단한 조직을 xylene, alcohol, 증류수 순으로 씻고서 Boun 용액으로 염색하여 picric acid를 제거하기 위하여 다시 alcohol로 씻었다. 그 후에 Weigert iron, hematoxylin 용액, Biebrich scarlet-acid fuchin 용액, aniline blue 용액 등의 순으로 염색하여 acetic acid로 씻어 준 다음 약간 건조시켜 Canada balsam을 넣고 cover class를 덮은 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

2.6.3. 창상 폐쇄 길이의 계산

창상 유도 7일 후 랫드 피부의 절개 부위 길이를 caliper (Mitutoyo, 20-1 Sakado 1-chome, Japan)로 측정하여 창상 길이로 간주하였으며, 창상 폐쇄는 절개 부위 길이로부터 창상회복 후 길이의 백분율로 계산하였다.

2.6.4. Collagen 밀도 측정

Collagen 밀도는 광학 현미경과 image analyser (IK-642K Toshiba CCD color camera, Toshiba Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. Masson's trichrome 염색한 조직의 진피에서 0.018 mm²에서 100배로 확대하여 백분율을 구하였다.

2.6.5. 조직 관찰

피부조직을 H&E, Masson's trichrome 방법으로 염색한 후에 외피의 폐쇄 정도, 진피 중 fibroblast의 수적 변화와 collagen의 변화를 광학 현미경으로 관찰하였다.

2.7. 통계처리

Student's t-test를 이용하여 평균 ± 표준편차(standard deviation)로 표시하였고, p-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

Table 1. The Length and Closure of Wound, Collagen Density and Epidermis Thickness in Wound Healing Induced Skin of Young and Old Rats

Item	Young rats	Old rats
Wound length (mm)	3.62±0.79	5.39±0.54*
Wound closure (%)	63.77±7.89	46.14±5.40*
Collagen density (%)	34.60±9.96	23.13±6.18**
Epidermis thickness (μm)	153.68±25.72	118.32±42.96**
n	11	11

*: p < 0.005, Significantly different from young skin; **: p < 0.05, Significantly different from young skin

3. 결 과

3.1. 일반적인 관찰

10 주령 랫드군에서는 일주일 후에 체중이 15.8% 증가하였고, 25 주령 이상의 랫드에서는 2.2%의 체중 감소가 관찰되었다. 창상 치유의 육안적인 관찰에서는 10 주령군의 11 랫드 중 8 마리에서 창상 유도 4~5일 후에 외피가 폐쇄되었고, 7일 후에는 한 마리를 제외한 10마리에서 외피의 폐쇄가 나타났다. 25 주령 이상 랫드군에서 창상 유도 5일째에서 11마리 중 6마리에서 나타나기 시작하여 7일 후에 8마리에서 외피의 폐쇄가 나타났다.

3.2. 창상의 폐쇄, 길이, 외피의 두께 변화

창상 회복 후 흉터의 길이는 25 주령 이상의 랫드군에서 10 주령 랫드군과 비교했을 때 48.8% 유의성 있게 길었고, 외피의 폐쇄는 38.2% 유의성 있게 낮게 나타났다(p<0.005). 그리고 10 주령 랫드군에서 25 주령 이상 랫드군보다 collagen 밀도가 49.8%, 외피의 두께가 29.8% 유의성 있게 높게 관찰되었다(Table 1, p<0.05).

3.3. 피부 조직 중 collagen 양의 변화

25 주령 이상 랫드군의 정상 피부 중 collagen 양은 정상 조직에서 17.3~2.6 mg/g이고, 창상이 치유된 조직 중에서는 17.8~2.8 mg/g으로 정상군보다 높게 나타났으나 유의성은 검증되지 않았다. 10 주령 랫드군에서는 25 주령 이상 랫드군과 비교했을 때 정상 조직은 약 49% 정도 유의성 있게 높게 나타났고(p<0.05), 창상유도 조직에서는 26.5% 높게 나타났고(Figure 1, p<0.005). 그리고 정상 조직과 비교했을 때 창상유도 조직에서 17.8% 유의성 있게 낮게 나타났고(p<0.05).

3.4. 피부 조직 중 MDA의 변화

10 주령군의 정상 피부중의 지질과산화 지표 물질인 MDA 양은 정상 조직에서 1291.7~634.9 nmol/g이고, 25

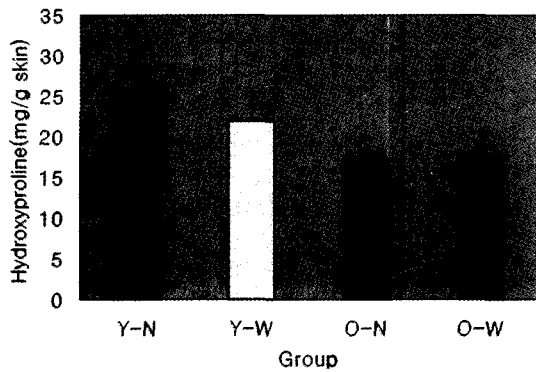


Figure 1. The contents of hydroxyproline in normal and wound healing induced skin of young and old rats. Y-N: young normal skin, Y-W: young wound healing induced skin, O-N: old normal skin, O-W: old wound healing induced skin, *: $p < 0.005$, Significantly different from old normal and wound skin; #: $p < 0.05$, Significantly different from young normal skin.

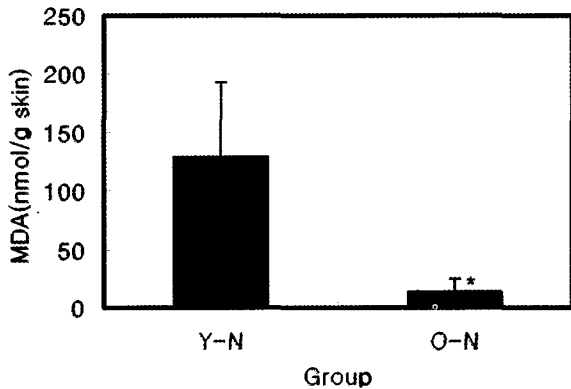


Figure 2. The concentration of malondialdehyde in normal and wound healing induced skin of young and old rats. Y-N: young normal skin, O-N: old normal skin, *: $p < 0.005$, Significantly different from young normal skin.

주령 이상의 랫드군에서는 148.3~10.5 nmol/g로 87.7% 정도 유의성 있게 낮게 나타났다(Figure 2, $p < 0.005$).

3.5. 피부조직의 형태학적 변화

10 주령 랫드의 진피에서 규칙적으로 배열된 collagen 섬유다발(fiber bundle)들이 섬유아세포들 사이에 관찰되었으나 25 주령 이상의 랫드에서는 collagen 섬유다발들 사이에 낭포(cyst)와 소와(lacuna)가 많고 섬유아세포 수는 적게 나타났다(Figure 3A, B). 또한 외피와 진피의 결합이 느슨해지고, 창상 부위의 외피가 완전히 붕합되지 않았으며, 10 주령 랫드에 비해 외피가 얇게 관찰되었다(Figure 3C, D).

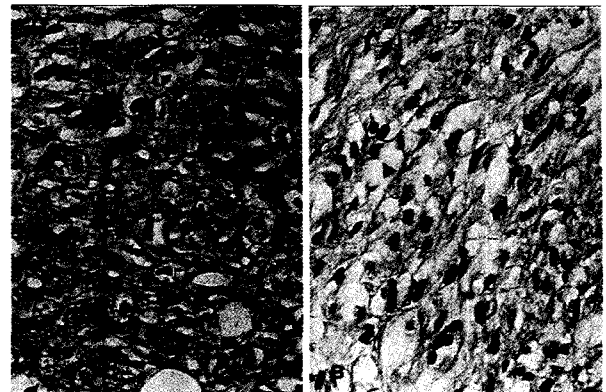


Figure 3. The wound healed skin of young and old by staining of Masson's trichrom (x100). A: young rat, B: old rat, ▶ collagen, ⇒ fibroblast.

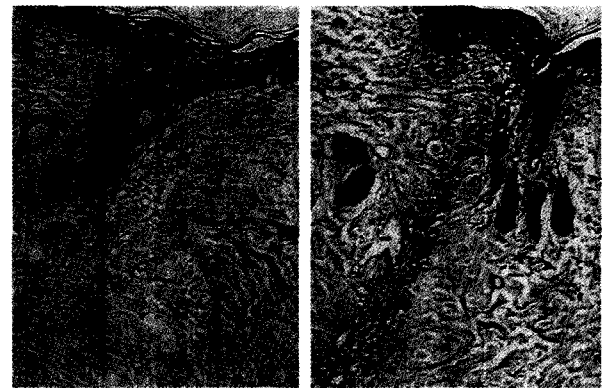


Figure 3. The wound healed skin of young and old by staining of hematoxylin & eosin (x40). C: young rat, D: old rat, D: dermis, G: granulation tissue, ED: epidermis.

4. 고 찰

나이에 의한 생리 기능 저하로 초래되는 자연노화, 자외선, 지질과산화 등과 같은 내적인 요인과 외적인 요인으로 발생하는 피부노화는 과도한 지질과산화가 초래하는 진피의 탄력섬유인 collagen 양의 변성과 양적인 감소를 동반하면서, glycosaminoglycan을 침착시켜서 결과적으로 주름과 피부 처짐(늘어짐)을 나타낸다고 알려져 있다[18,19]. 피부 노화 예방 또는 저지를 할 수 있는 기능성 화장품의 개발이 전세계적으로 요구되고 있는 상황에서 본 연구에서는 정상적인 피부와 창상을 유도한 10 주령 랫드와 25 주령 이상의 랫드 피부에서 지질과산화의 지표와 탄력섬유를 구성하는 collagen의 양적인 변화를 관찰하여 기능성 화장품 개발시에 검색 지표로 사용할 수 있는 가능성을 조사하였다.

창상을 유도한 10 주령의 랫드군에서는 15.8%의 체중

증가와 함께 창상의 회복이 7일 만에 11마리 중 10마리에서 외피의 탈락과 함께 창상폐쇄가 관찰되었으나, 반면에 25 주령 이상의 랫드군에서는 오히려 2.2% 체중이 감소하는 현상과 함께 11마리중 8마리만이 창상이 회복되었다. 그리고 10 주령 랫드에서 창상 치유 후 흉터의 크기가 25 주령 이상의 랫드에서보다 유의성 있게 작았고, 외피 폐쇄, collagen 밀도와 외피의 두께가 유의성 있게 높게 관찰됨으로서(p<0.005, Table 1) 창상의 자연치유는 자연 노화가 시작된 25 주령 이상의 랫드보다는 생리적인 대사가 활발한 어린 랫드에서 빨리 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

또한 피부 노화와 항노화의 검색 지표로 사용되는 hyp 양의 관찰에서는 10 주령 랫드군의 정상적인 피부와 창상 치유 유도 피부에서 hyp의 양이 25 주령 이상 랫드군보다는 높게 나타났을 뿐만 아니라(Figure 1), 진피에서 규칙적으로 배열된 collagen 섬유다발들이 섬유아세포 사이에 분포되어 있는 형태학적 변화가 관찰되었다. 또한 피부 조직 중 높은 collagen 양은 조직 중 증가된 collagen 밀도와도 일치한다. 본 연구의 결과를 종합할 때 피부 조직중 hyp 양의 측정은 조직의 형태학적 관찰없이 피부 노화로 인한 주름의 형성과 항노화 개선효과의 검색에 지표로 사용할 수 있다고 사료된다.

25 주령 이상 랫드에서 hyp 양의 감소와 함께 조직학적 관찰에서 collagen 밀도의 감소와 교차 결합된 collagen fiber bundle과 함께 섬유아세포의 수적인 감소가 나타난 것은, collagen 교차결합은 증가하고 교원섬유가 두꺼워지고, 용해도와 팽창력이 감소하고, 사람에게 있어서 collagen은 성인이 된 후에 1%씩 감소한다는 보고와 일치한다[1]. 또한 Bahar 등[20]은 피부세포에서 ECM을 구성하는 이종의 collagen type I과 III가 발현된다고 보고하였는데 10 주령 랫드에서는 collagen의 축적보다는 합성이 많이 진행되는 반면에 25 주령 이상의 랫드에서는 노화와 함께 수반되는 결합조직(connective tissue)이 많은 진피에서 잔류하고 collagen 합성보다는 축적이 많이 된 것으로 사료되며(Figure 3C, D), 이를 뒷받침하기 위해서는 fibrilla collagen인 collagen type I, type III와 type IV mRNA의 발현을 관찰할 필요성이 있다.

최근의 연구에서 지질과산화 지표인 MDA는 UVr (ultra-violet radiation)에 의한 노화가 유도된 피부에서 증가된다고 보고되고 있으나[15,21], 본 연구에서는 노령의 랫드에서 10 주령 랫드보다 유의성 있게 낮게 나타난 결과는 지금까지의 보고와는 차이가 있는데(Figure 2, p<0.005), 이는 피부조직 관찰에서 진피 중에 섬유아세포 수는 적고 많은 소와(lacuna)와 낭포(cyst)가 collagen 섬유아세포 사이에 존재하는 것이 그 원인이거나 또는 균질화 과정에서 노령 랫드의 피부에서 collagen의 교차결합이 증

가되고 두꺼워진 교원섬유가 균질화가 잘 안되어서 MDA의 용출이 감소된 것으로 생각할 수 있으나, 정상적인 세포에서도 free radical에 의한 지질과산화가 진행되는데 25 주령 이상의 랫드에서 극히 적은 양의 MDA가 측정된 것은 정상적인 생체내에서도 지질과산화는 진행이 되는데 극히 적은 양의 MDA가 측정된 것은 무엇보다도 섬유아세포의 수적인 감소에 기인한다고 사료된다.

따라서 본 연구에서 나타난 결과로 볼 때 항노화 작용이 있는 기능성 화장품 개발 시에 지질과산화 지표인 MDA와 collagen 합성 및 축적 지표인 hyp의 측정은 항노화 예방 및 개선제의 모니터링 연구에서 매우 유용하고, 이러한 지표를 사용할 경우에는 랫드보다는 마우스를 사용하는 것이 바람직하며 hyp의 측정 방법은 피부 유연성과 주름의 지표로 사용이 가능하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 한의학전문대학원 BK사업비에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. H. H. Kang, Anti-aging in cosmetics, *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **23**, 57 (1997).
2. L. X. Shao, Effects of the extract from bergamot and boxthorn on the delay of skin aging and hair growth in mice, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **28**, 766 (2003).
3. S. K. Park, M. Y. Chang, Y. D. Kim, B. Y. Jeong, Y. H. Won, J. J. Kim, and S. H. Kang, Changes of facial wrinkle after topical application of on emulsion containing medimin A, *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **25**, 23 (1999).
4. J. J. Cho, G. K. Lee, B. K. Cho, and J. D. Choi, Isolation and characterization of elastase inhibitor from *Areca catechu*. *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **26**, 24 (2000).
5. J. S. Hwang, The effects of retinoids on Crabbp II mRNA induction and collagen synthesis in human dermal fibroblast. *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **23**, 9 (1997).
6. C. W. Lee, H. B. Pyo, Y. H. Cho, and S. M. Park, Effect of Korean black soybean seed on the cellular proliferation and the production of type III collagen in skin fibroblast. *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **24**, 31 (1998).

7. B. J. Kim, B. K. Jo, and J. H. Kim, A promising new anti-wrinkle ingredient: Pericarpium castaneae extracts. *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **10**, 57 (1999).
8. R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, and B. A. Freeman, Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 481 (1991).
9. Y. M. Janssen, B. Van Houten, P. J. Borm, and BT. Mossman, Cell and tissue responses to oxidative damage, *Lab. Invest.*, **69**, 261 (1993).
10. S. J. Kang, The role of reactive oxygen species on UVA-induced aging of dermal collagen, *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **18**, 64 (1992).
11. M. M. Rane and S. A. Mengi, Comparative effect of oral administration and topical application of alcoholic extract of Terminalia arjuna bark on incision and excision wounds in rats, *Fitoterapia*, **74**, 553 (2003).
12. A. Geerts, D. Schuppan, S. Lazeroms, R. De Zanger, and E. Wisse, Collagen type I and III occur together in hybrid in the space of disse the rat liver. *Hepatol.*, **11**, 234 (1990).
13. D. Schuppan and E. Hahn, Components of the extracellular matrix (collagen, elastin, glycoproteins and proteoglycans), Mesenchymal-epithelial interactions in neural development, Nato Asi., Edited by J.R. Wolff et al. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, **5**, 2 (1987).
14. J. V. Kamath, A. C. Rana, and A. R. Chowdhury, Pro-healing effect of Cinnamomum zeylanicum bark, *Phytother Res.*, **17**, 970 (2003).
15. J. Dissemond, L. A. Schneider, P. Brenneisen, K. Briviba, J. Wenk, M. Wlaschek, and K. Scharffetter-Kochanek, Protective and determining factors for the overall lipid peroxidation in ultraviolet A1-irradiated fibroblasts: in vitro and in vivo investigations. *Br. J. Dermatol.*, **149**, 341 (2003).
16. I. S. Jamall and V. N. Finelli, A single method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissue, *Anal. Biochem.*, **112**, 70 (1981).
17. H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351 (1979).
18. J. I. Yun, Skin aging, *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **7**, 16 (1994).
19. H. Kambayashi, M. Yamashita, Y. Odake, K. Takada, Y. Funasaka, and M. Ichiashi, Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse, *J. Dermatological Science*, **27**, 19 (2001).
20. M. Ali Bahar, B. Bauer, E. Tredget, and A. Ghahary, Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Repair Regen.*, **12**, 175 (2004).
21. A. Oikarinen and M. Kallionen. A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin. *Photodermatol.*, **6**, 24 (1989).