

곰취의 항산화와 UVA에 의한 MMP-1 발현 저해효과

나 영[†] · 김진화 · 심관섭 · 이범천 · 표형배

한불화장품(주) 기술연구소
(2006년 6월 14일 접수, 2006년 7월 18일 채택)

Effect of Antioxidation and Inhibition of Matrix Metalloproteinase-1 from *Ligularia fischeri*

Na Young[†], Jin Hwa Kim, Gwan Sub Sim, Bum Chun Lee, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co. Ltd., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-830, Korea
(Received June 14, 2006; Accepted July 18, 2006)

요약: 본 연구는 곰취 추출물의 항산화, 지질과산화 억제 및 자외선 조사에 의해 유도된 MMP-1 발현에 대한 영향을 사람 섬유아세포를 이용하여 확인하였다. 곰취의 DPPH와 superoxide radical 소거효과는 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 소거효과를 나타냈으며, 각각 5 mg/mL에서 82.3%와 79.3%로 DPPH와 superoxide radical을 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 곰취 추출물의 지질과산화 억제효과는 500 µg/mL에서 97.0%로 지질과산화 억제효과도 우수하게 나타났다. 또한 자외선에 의해 증가된 사람 섬유아세포의 MMP-1 단백질 발현양은 곰취 추출물을 100 µg/mL 농도를 처리함으로써 약 35%로 감소되었다. 곰취 추출물은 항산화 효과, 지질과산화 억제효과 및 자외선 조사에 의해 유도되는 MMP-1 단백질 발현량을 조절하는 기능을 갖는 것을 확인하였다. 따라서 곰취는 항산화, 지질과산화 억제 및 자외선에 의해 유도되는 MMP-1 발현을 저해함으로써 항노화 소재로써 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: In this study, we examined the effects of antioxidant, lipid peroxidation inhibition and suppression of UVA-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblasts. *Ligularia fischeri* extract showed free radical scavenging effect by 82.3% at 5 mg/mL and superoxide radical scavenging effect by 79.3% at 5 mg/mL in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. At the concentration of 500 µg/mL, *L. fischeri* extract showed 97% inhibition on lipid peroxidation of linoleic acid. UVA induced MMP expression in human dermal fibroblasts was reduced 35% by treatment with 100 µg/mL of *L. fischeri* extract. These results suggest that *L. fischeri* extract can be used for an anti-aging agent by antioxidation, lipid peroxidation inhibition and reducing UVA-induced MMP-1 production.

Keywords: *Ligularia fischeri*, antioxidation, MMP-1, human dermal fibroblast, anti-aging

1. 서 론

피부 노화는 복합적인 생물학적 현상으로 크게 내인성 노화와 광노화로 구분되어 진다[1]. 나이가 들에 따라 피부는 잔주름, 피부건조증, 탄력감소 등의 특징이 나타난다. 반면, 광노화 피부는 내인성 노화에 비하여 심하고 일찍부터 관찰되며, 굵고 깊은 주름이 발생하고, 잔주름도 많이 발생한다. 또한 색소침착, 피부건조 및 탄력감소의 현상도 일어난다[2]. 이러한 탄력감소 및 주름발생 같은 현상의 원인은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)

의 발생, 지질의 과산화(lipid peroxidation) 및 콜라겐 분해효소의 발현에 의한 피부구조의 주요 성분인 콜라겐에서의 변화 때문으로 여겨진다.

자외선의 조사는 피부에서 다양한 생화학적 반응을 일으킨다. 자외선으로의 노출은 피부내의 활성산소종의 발생을 증가시키고, 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어체계의 불균형을 초래하여 DNA, 세포막 및 단백질 등 세포 성분들에 대한 산화적인 스트레스를 유발한다[3]. 그중 산소 유리기에 의한 세포손상에서 지질과산화반응은 중요한 손상 기전이다[4]. 체내의 세포, 막 또는 지단백질의 지질은 활성산소의 유리기에 의해 연쇄반응을 일으켜 지질라디칼을 형성한다. 이러한 지질 라디칼은 활성산소

[†] 주 저자 (e-mail: nayoung@hanbul.co.kr)

중에 비해 반응성이 길며 주로 세포 내부에 작용하여 세포내 구성성분을 파괴한다. 또한 지질 유동성의 감소, 막 투과성의 변질 등이 일어나며, malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal 같은 수명이 길고, 독성인 과산화물을 만들어 급성조직장애 및 세포노화를 유도하여 각종 성인병 및 발암의 원인이 된다[4,5].

또한 활성산소종은 진피의 extracellular matrix (ECM) 결합조직인 콜라겐 및 엘라스틴 분자의 절단 및 비정상적인 교차결합 등의 손상을 야기한다[6]. 진피 층의 90%는 콜라겐으로 구성되어 있어 콜라겐의 감소는 피부노화와 밀접한 관계를 가진다. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 ECM과 기저막 분해에 관여하는 여러 효소의 family로 구조와 기능적 특성에 따라 interstitial collagenase, stromelysin, gelatinase 및 membrane-associated MMPs의 네 개의 subfamily로 나누어진다[7]. 생체 내에서 zymogen 형태로 분비되어 아미노 말단 부위의 절단에 의해 효소활성을 가지게 되고, 활성화된 MMPs는 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 같은 저해제에 의해 활성이 조절되어, 피부의 keratinocyte, fibroblast를 포함한 대다수의 세포에서 tissue remodeling, healing cascade에 사용된다[6,8]. 자외선에 의해 손상 받은 피부는 콜라겐의 양이 감소되어 있는데 이는 자외선에 의해 피부 내에서 MMPs의 발현이 증가하기 때문이며, MMPs가 광노화에 중요한 역할을 하고 있음이 보고되어 있다[9,10].

곰취(*Ligularia fischeri*)는 여러 해살이 식물로서 취나물 중 가장 큰 잎을 가지고 있으며 산속 깊은 곳이나 고원의 습지에서 자란다. 곰취는 여러 가지 영양성분을 골고루 함유하고 있는데 특히 비타민 A, B1, B2, C, β -carotene과 niacin 등이 풍부하다[11]. 약리작용으로는 가래를 제거하고 기침을 멎게하는 작용, 복수암에 대한 일정한 항암작용, 이질간균, 녹농간균 등에 대한 항균작용, 민간요법으로 종기의 고풍을 제거하는 작용 등이 알려져 있다. 주요 성분으로는 항암효과를 나타내는 terpenoid류[12,13], 항염효과를 나타내는 eremophilane류[13,14] 등이 보고되어 있다.

본 연구는 한국의 야생 식물인 곰취의 항산화 효과, 지질과산화 억제효과 및 UVA를 조사한 배양된 사람섬유아 세포에서 MMP-1 효소의 발현 저해 효과를 검색하여 항노화 소재로서 이용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 곰취(*Ligularia fischeri*)는 강원도 지역에서 재배된 산야초로 국내 약초시장에서 구입하였

다. 그늘진 곳에서 건조한 곰취 100 g을 분쇄하여 95% 에탄올 1 L로 환류하면서 3 h씩 2회 반복 추출하였다. 이를 감압 농축, 동결 건조하여 50% butylene glycol에 용해하여 실험에 사용하였다.

Butylated hydroxyanisole (BHA), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)는 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2.2. 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis 방법[15]으로 측정하였다. 시료를 10배 희석한 희석액 1 mL에 Folin 시약 1 mL을 첨가하여 1 mL의 20% Na_2CO_3 를 가하였다. 이 혼합액을 1 h 동안 방치한 후 UV/visible spectrophotometer (CARY 1E, varian, USA)를 사용하여 680 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

2.3. Free Radical 소거효과

시료의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Aldrich, USA) radical 소거효과를 분석하기 위해 Blois 법[16]을 활용하였다. 0.1 mM의 DPPH 용액에 동일량의 곰취 추출물을 첨가하여 vortex mixer로 10 sec간 진탕한 후 실온에서 10 min 동안 반응시킨다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. Superoxide Radical 소거효과

Xanthine/Xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법[17]에 의해 측정하였다. 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 곰취 추출물을 첨가하여 25°C에서 10 min 간 반응시켰다. 이 반응액에 최종농도가 0.25 U/mL가 되도록 xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25 min 동안 반응 후 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 지질과산화 억제효과

Linoleic acid model system을 이용하여 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 법으로 지질과산화 억제효과를 측정하였다[18]. Linoleic acid (2.85 mg/mL)와 Tween 20 (2.85 mg/mL)을 40 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 첨가하여 반응기질로 사용하였다. 과산화 유도는 기질용액과 시료를 혼합하여 80°C에서 120 rpm으로 7 h 반응시켰다. 과산화가 유도된 시료에 산화정지를 위해 3.6% BHA용액과 600 μL TBA-TCA 용액(thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid, 0.25 N HCl)를 첨가한 후

Table 1. Total Polyphenol Content and Antioxidative Activity of *L. fischeri* Extract on DPPH and Superoxide Radical Scavenging Activities

Sample	Conc. (mg/mL)	DPPH radical scavenging (%)	Superoxide radical scavenging (%)	Total polyphenols (μg/mg)
<i>L. fischeri</i>	0.1	27.2 ± 0.3	48.2 ± 1.9	184.76
	1	58.3 ± 1.2	59.3 ± 2.1	
	5	82.3 ± 1.6	79.3 ± 1.5	
BHA ¹⁾	0.1	81.44 ± 2.7	58.2 ± 2.2	
EGCG ²⁾	0.05	96.7 ± 2.3	89.74 ± 1.9	

¹⁾ BHA (3-t-butyl-4-hydroxyanisole)

²⁾ EGCG ((-)-epigallocatechin gallate)

The data were expressed as mean values (± S.D.) of three experiments.

boiling water bath에서 30 min 간 발색 반응시킨다. 냉각 후 chloroform을 첨가하여 진탕시키고, 3000 rpm에서 5 min 간 원심분리하여 그 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

2.6. 세포 배양

신생아의 표피조직에서 분리한 human dermal fibroblasts (HDF)는 Modern Tissue Technology (MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 DMEM/F12 (3:1) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10 세대 세포를 실험에 이용하였다.

2.7. 세포 생존률 측정

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 정량은 Mosmann[19]의 방법을 변형하여 실시하였다. HDF를 2 × 10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 곰취 추출물을 투여하여 CO₂ 배양기에서 24 h 배양하였다. MTT 용액(5 μg/mL)을 첨가하고 4 h 후 원심 분리하여 상등액을 제거하고 100 μL acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 570 nm에서 microplate reader (Model ELX 800, BIO-TEK Instruments Inc, USA)로 흡광도를 측정하였다.

2.8. UVA 조사 및 시료의 처리

HDF를 1.5 × 10⁵ cells/mL의 농도로 35 mm dish에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한다. UV 조사 전에 배양배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum을 제거 후 6.3 J/cm² UVA (UVA F15T8BLB, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. UVA 조사 후 배양 배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3 : 1) 배지에 곰취 추출물을 투여하여 24 h 배양하였다.

2.9. MMP-1 발현저해 측정

HDF에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24 h 배양한 배지를 96 well plate에 분주하여 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 3회 세척하고 3% BSA (bovine serum albumin)/PBS로 37°C, 1 h 동안 blocking 한 후 monoclonal anti-MMP-1 (mouse)을 1 : 3000으로 blocking solution (3% BSA)에 희석하여 150 μL 씩 분주하고 37°C, 90 min 간 반응시켰다. Anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 1 : 3000으로 blocking solution에 희석하여 150 μL씩 분주하고 37°C, 90 min 간 반응시킨 후 PBS-T로 세척한 다음 diethanolamine buffer에 1 mg/mL pNPP (p-nitrophenyl phosphate)를 포함한 기질 용액 150 μL를 넣어 실온에서 30 min 간 반응시켰다. 3 N NaOH 50 μL를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 microplate reader을 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.10. 자료분석 및 통계처리

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH Radical 소거 효과

DPPH radical은 반응 중 전자를 공여 받아 고유의 청남색이 옅어지는 특성이 있으므로 이러한 색차를 비색정량하여 시료가 갖는 free radical의 능력을 측정할 수 있으며, 지질과산화 초기 반응의 억제정도를 예측 할 수 있다.

본 실험에서는 곰취 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH를 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 양성대조군으로는 항산화 효과가 알려진 BHA와 EGCG를

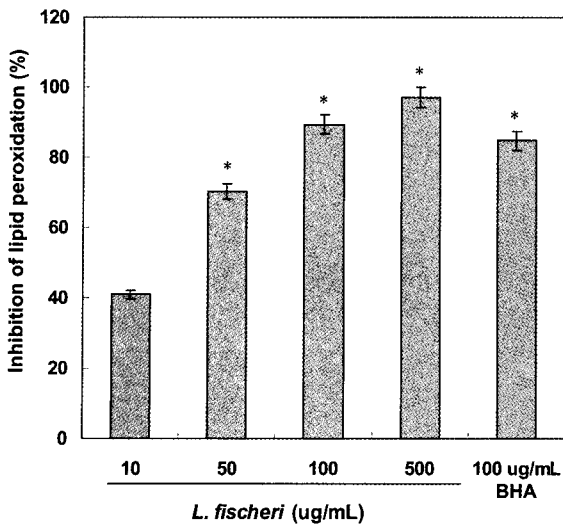


Figure 1. Inhibition of lipid peroxidation of *L. fischeri* extract. Amounts of dried extract were present in 5 mL of linoleic acid emulsion (0.04 M, pH 7.4). The control was the linoleic acid emulsion without extract. BHA was used as a positive control. The results are mean of triplicate samples with S.D. *p < 0.05 compared with control.

이용하여 곰취의 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 BHA는 0.1 mg/mL 농도에서 81.4%, EGCG는 0.05 mg/mL 농도에서 96.7%의 DPPH radical을 소거하였으며, 곰취는 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈다(Table 1). 곰취를 0.1, 1, 5 mg/mL의 농도로 처리한 경우 각 DPPH radical 소거능은 27.2, 58.3, 82.3%로 우수한 free radical 소거효과를 나타내었다.

3.2. Superoxide Radical 소거효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응계에서 형성되는 superoxide radical에 대한 저해작용을 측정함으로써 곰취의 superoxide radical 소거효과를 평가하였다.

양성대조군으로 BHA와 EGCG를 이용하여 superoxide radical 소거효과를 비교한 결과, BHA는 0.1 mg/mL 농도에서 58.2%, EGCG는 0.05 mg/mL 농도에서 89.7%의 superoxide radical을 소거하였으며, 곰취는 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타냈다. 곰취를 0.1, 1, 5 mg/mL의 농도로 처리한 경우 각 superoxide radical 소거능은 48.2, 59.3, 79.3%로 우수한 superoxide radical 소거효과를 나타내었다(Table 1).

3.3. 지질과산화 억제효과

노화가 유도된 피부에서는 지질과산화 산물인 malondialdehyde (MDA)의 발생량이 증가한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 발생한 MDA를 지질과산화의 지표물

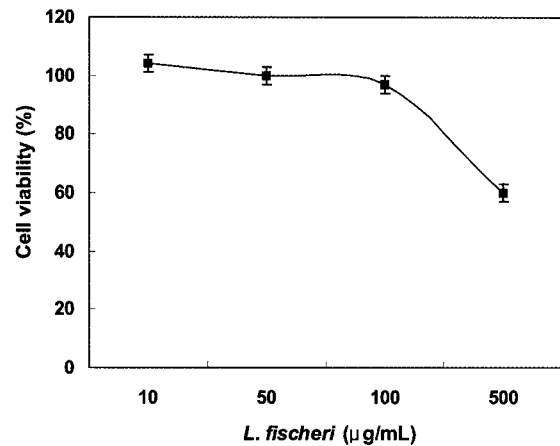


Figure 2. Relative cell viability of *L. fischeri* extract on human dermal fibroblasts by MTT assay. The cells were treated with various concentration of *L. fischeri* for 24 h. The results are mean of triplicate samples with S.D.

질로 정하여 2-thiobarbituric acid (TBA)법을 이용하여 측정함으로써 곰취 추출물의 지질과산화 억제효과를 평가하였다. 곰취를 10, 50, 100, 500 µg/mL의 농도로 처리한 경우 각 지질과산화 억제효과는 40.2, 70.3, 89.3, 97.0%로 우수한 지질과산화 억제효과를 나타내었다. 양성대조군인 BHA는 100 µg/mL에서 84.5%의 지질과산화 억제효과를 나타내었다(Figure 1).

3.4. 세포독성

곰취 추출물의 세포독성 측정과 더불어 실험에 사용할 농도 범위를 결정하기 위해서 MTT assay를 시행하였다. HDFs에 대한 곰취 추출물의 세포독성을 측정된 결과, 곰취 추출물은 200 µg/mL 이하의 농도로 처리 시 섬유아세포의 생존에 영향이 없는 것으로 확인되어 이후 실험에서는 200 µg/mL 이하의 농도로 실험을 진행하였다(Figure 2).

3.5. MMP-1 발현저해 효과

피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성화도가 증가하고 전사인자인 activator protein-1 (AP-1)의 활성화도가 증가되는 신호전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다. 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 곰취가 미치는 영향을 알아보고자 섬유아세포에 6.3 J/cm² UVA를 조사하고 곰취 추출물을 첨가하여 24 h 배양한 후 MMP-1 발현저해 효과를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 통해 알아보았다. 그 결과 곰취는 농도 의존적으로 MMP-1의 발현저해 효과를

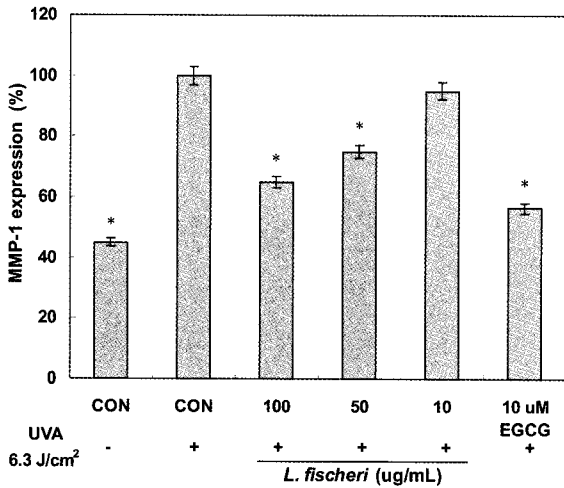


Figure 3. The effect of *L. fischeri* extract on the production of MMP-1 by the irradiated human dermal fibroblasts. The cells were treated with various concentration of *L. fischeri* for 24 h. The results are mean of triplicate samples with S.D. *p < 0.05 compared with control.

나타내었다. 곰취를 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리한 경우 각 MMP-1 발현저해 효과는 0.5, 25, 35%로 우수한 MMP-1 발현저해 효과를 나타내었다. 양성대조군인 EGCG는 10 µM에서 43.5%의 MMP-1 발현저해 효과를 나타내었다(Figure 3).

4. 결 론

곰취 추출물의 항산화, 지질과산화 억제 및 자외선 조사에 의해 유도된 MMP-1 발현에 대한 영향에 연구하였다. 곰취의 DPPH와 superoxide radical 소거효과는 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 소거효과를 나타냈으며, 각각 5 mg/mL에서 82.3%, 5 mg/mL에서 79.3%로 DPPH와 superoxide radical을 소거하여 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 또한 곰취 추출물의 지질과산화 억제효과는 500 µg/mL에서 97.0%로 지질과산화 억제효과도 우수하게 나타났다. 또한 자외선에 의해 증가된 세포내 MMP-1 단백질의 양이 곰취 추출물을 처리함으로써 100 µg/mL 농도에서 35%로 감소되었다. 곰취 추출물은 항산화 효과, 지질과산화 억제효과 및 자외선 조사에 의해 유도되는 MMP-1 단백질 발현량을 조절하는 기능을 갖는 것을 확인하였다. 따라서 곰취는 항산화와 자외선에 의해 유도되는 MMP-1 발현을 저해함으로써 항노화 소재로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. B. A. Gilchres, Skin aging and photo aging: An overview, *J. Am Acad. Dermatol.*, **21**, 610 (1989).
2. J. Y. Seo, K. H. Cho, H. C. Eun, and J. H. Chung, Skin aging from phenotype to mechanism, *Kor. J. Invest. Dermatol.*, **8**, 187 (2001).
3. S. K. Karin, B. Peter, W. Jutta, H. Gernot, M. Weijan, K. Lale, M. Christian, and W. Meinhard, Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms, *Experimen. Gerontol.*, **35**, 307 (2000).
4. A. W. Girotti, Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological system, *J. Lipid Res.*, **39**, 1529 (1998).
5. B. Halliwell and S. Chirico, Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *Am. J. Clin. Nutr.*, **57**, 715 (1993).
6. J. H. Chung, J. Y. Seo, H. R. Choi, M. K. Lee, C. S. Youn, G. Rhie, K. H. Cho, K. H. Kim, K. C. Park, and H. C. Eun, Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 1218 (2001).
7. S. D. Shapiro, Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 602 (1998).
8. E. J. Bernhard, S. B. Gruber, and R. J. Muschel, Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **91**, 4293 (1994).
9. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, and J. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid, *Photochem. Photobiol.*, **69**, 154 (1999).
10. AOAC, Official method of analysis, 16th ed. Association of official analytical chemists, Washington D. C. (1985).
11. 농촌진흥청 생활연구소: 식품성분표(제5개정판), 86 (1996).
12. K. T. Lee, S. J. Koo, S. H. Jung, J. Choi, H. J. Jung, and H. J. Park, Structure of three new terpenoids, spiciformisins a and b, and monocyclosqualene, isolated from the herbs of *Ligularia fischeri* var. spiciformis and cytotoxicity, *Arch Pharm. Res.*, **25**, 820 (2002).

13. H. J. Park, S. H. Kwon, K. O. Yoo, I. C. Sohn, K. T. Lee, and H. K. Lee, Sesquiterpenes from the leaves of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*, *Planta Med.*, **66**, 783 (2000).
14. B. Y. Hwang, J. H. Lee, T. H. Koo, H. S. Kim, Y. S. Hong, J. S. Ro, K. S. Lee, and J. J. Lee, Furanoligularenone, an eremophilane from *Ligularia fischeri*, inhibits the LPS-induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in macrophage RAW264.7 cells, *Planta Med.*, **68**, 101 (2002).
15. G. S. Sim, J. H. Kim, Y. Na, D. H. Lee, B. C. Lee, Y. H. Zhang, and H. B. Pyo, Anti-oxidative and inhibitory effect of *Saussurea involucrata* on MMP-1 in UVA-irradiated human dermal fibroblast, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **31**, 329 (2005).
16. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
17. K. Furuno, T. Akasako, and N. Sugihara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Bul.*, **25**, 19 (2002).
18. A. M. Romero, M. M. Dobal, M. A. Sturla, and M. A. Judis, Antioxidant properties of polyphenol-containing extract from soybean fermented with *Saccharomyces cerevisia*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **106**, 424 (2004).
19. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods.*, **65**, 55 (1983).