

NIH3T3 세포에서 UVB에 의한 세포고사와 DNA 단사절단에 미치는 fisetin의 효과

정세진¹ · 김돈영 · 한설희 · 신상민 · 차재영 · 박노복² · 이정섭³ · 박종균*

원광대학교 생명과학부, ¹원광대학교 기초과학연구소, ²한국 농업전문학교 화훼학과, ³조선대학교 생명공학과

Received December 19, 2006 / Accepted January 18, 2007

Effect of fisetin on UVB-induced apoptosis and DNA single strand breaks in NIH3T3 cells. Se Jin Jeong¹, Don Young Kim, Seol Hee Han, Sang Min Shin, Jae young Cha, Nou Bog Park², Jung Sup Lee³ and Jong Kun Park. *Division of Biological Science, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, ¹Institute of Basic Natural Science, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, ²Department of Floriculture, Korea National Agricultural College, Suwon, ³Department of Biotechnology, Chosun University Kwangju* – In the present study, we have investigated the effect of fisetin on the apoptosis and DNA single strand breaks in ultraviolet light B (UVB)-exposed NIH3T3 cells. Exposure of cells to UVB light (200 J/m²) and post-incubation in growth medium for 48 hr resulted in about 50% of cells with apoptotic nuclear fragmentation. Addition of various concentrations of fisetin in the postincubation medium, however, significantly reduced the apoptotic nuclear fragmentation as compared with the values expected when the effects are additive and independent. DNA single strand breaks induced by UVB exposure were also significantly decreased by postincubation with fisetin. By Western blot analysis, fisetin post-incubation was shown to attenuate the p53 upregulation upon UVB exposure. Furthermore, the decrease of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) level upon UVB exposure was alleviated by fisetin postincubation. These results suggest that fisetin decrease the apoptosis and increase DNA repair in a possible association with alteration of p53 and PCNA levels in UVB-exposed cells.

Key words – fisetin, UVB, DNA single strand breaks, apoptosis

자외선은 중요한 환경적인 요인으로 많은 세포들의 증식, 생존 그리고 기능에 영향을 끼친다. 자외선은 파장에 따라 3 가지 형태로 분류되는데 파장이 긴 UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) 그리고 파장이 짧은 UVC (200-280 nm)로 분류된다[11]. UVB에 의한 DNA 상해는 cyclobutane pyrimidine 이량체와 pyrimidine (6-4) pyrimidine 광산물들로 DNA 상해 특이적으로 작용하는 절제효소 복합체의 절제에 의해 상해부위가 포함되는 뉴클레오티드가 제거되는 뉴클레오티드 절제회복에 의해 회복되는데 이 단계 중 중합단계에서 증식 세포 핵항원(PCNA)가 참여한다[1].

한편, UVB 상해 중 회복되지 않은 것들은 핵분절로 특징 지워지는 세포고사 과정으로 빠지게 된다[2]. UVB에 의한 DNA 회복과 세포고사의 과정은 p53의 활성화와 이의 하위 단계의 효과자들인 p21, GADD45, Mdm2 등의 활성 증가와 동반된다[5]. p21은 세포주기의 저해자로서 작용하여 DNA 복제 및 DNA 회복과 관련된 PCNA의 활동을 저해한다[22].

DNA 상해 반응이나 유전 독성에 대해 변화를 유발하는 천연물들을 검색하는 일은 항암제나 항노화제, 자외선 보호제 등의 개발과 관련하여 중요한 의미를 갖는다[23,25]. 유전 독성을 감소시키는 천연물들의 활성은 DNA 상해원의 해독 과정에 수반되는 활성산소종의 수준을 감소시키는 항산화화

성[6,20], 천연물의 직접적인 결합에 의한 DNA 상해원 농도의 감소[3,7], DNA 회복능이나 DNA 상해 반응의 신호 전달 수준의 증가 등이 포함될 수 있다[8,17].

본 연구자 등은 다양한 천연물 재료들을 대상으로 알킬 화제 상해 반응에 대한 검색 작업을 수행하여 왔고[8,9], 자외선 상해 반응에 대한 변화를 유발하는 물질로는 옷의 아세톤 추출물 및 이 추출물의 성분 중 하나로 본 연구팀에 의해 규명된 fisetin이 선정되었다. 본 연구에서는 섬유아세포인 NIH3T3 세포에서 fisetin이 UVB에 의한 세포고사 과정 중 나타나는 핵분절과 DNA 상해를 회복하는 과정 중 나타나는 DNA사의 절단에 어떠한 효과가 있는지를 세포고사 경로에 관련된 p53 단백질과 세포주기를 진행하는데 연관된 PCNA 단백질의 수준들의 변화와 관련하여 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양

실험에 사용한 세포주는 한국세포주은행에서 분양받은 mouse 섬유아세포인 NIH3T3 세포를 이용하였고, 이 세포들은 plastic petri dish 상에서 37°C, CO₂ (5%) 배양기에서 10% fetal bovine serum (GIBCO, 미국), penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml)이 존재하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, 미국) 조건에서 배양하

*Corresponding author

Tel : +82-63-850-6200, Fax : +82-63-843-2781

E-mail : jkpark@wonkwang.ac.kr

였고, exponential phase의 세포들을 0.025% trypsin-EDTA를 이용하여 계대배양하였다.

4. 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 염색에 의한 핵분절 분석

자외선을 조사하거나 조사하지 않은 세포들을 대상으로 fisetin (Sigma)을 적정시간 처리한 후 세포를 모은 다음 phosphate buffered saline (PBS) 200 μ l로 희석한 후 DAPI (Sigma)를 첨가하였다. DAPI를 첨가한 후 실온에서 20분간 염색한 후에 핵의 분절 정도를 형광현미경(Zeiss Axioskop 2 Plus)을 사용하여 관찰하였다. 전체 세포 중 세포고사에 의한 핵의 분절을 보이는 세포의 빈도를 구하여 그래프로 제시하였다.

알칼리 겔 전기영동

DNA 상해의 회복과정 중 절제 단계에서 나타나는 DNA 단사 절단 경향을 알아보기로 Sawyer 등의 방법[21]에 의한 알칼리 겔 전기영동을 수행하였다. 세포를 35 mm 배양접시에 동일 양을 분주하여 하루를 배양하고 UVB (200 J/m²)를 처리한 후 다양한 농도의 fisetin을 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후 모은 세포에 1% agarose (Sigma) 15 μ l를 넣어 button을 만든 후 lysis buffer I (2.5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 10), 10 mM EDTA, 1% sarcosyl, 1% Triton X-100) 900 μ l를 처리하고 4°C에서 12 시간 방치한 후 lysis buffer II (2.5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 10), 10 mM EDTA) 500 μ l에 proteinase K (1 mg/ml, Sigma) 첨가하고 37°C에서 12 시간 반응시켰다. Lysis buffer III (2.5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 10), 10 mM EDTA, 1% sarcosyl) 900 μ l를 처리하고 4°C에서 1 시간에서 3 시간정도 반응시킨 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA) 900 μ l를 처리하고 5 분간 실온에서 반응시켰다. Alkaline loading dye (500 mM NaOH, 50% glycerol, 0.25% bromocresol green, Sigma) 300 μ l를 처리하고 30 분간 실온에서 반응시킨 후 0.4% agarose gel (gel buffer: 50 mM NaCl, 4 mM EDTA)에 button을 넣고 4°C에서 12 시간 방치하였다. 전기영동 (1.5 V/cm, 40-50 mA, 18 시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에 관찰하였다. 전기 영동한 밴드들의 역상 필름을 densitometer로 스캔하여 각 레인의 밴드들이 보이는 DNA 단사의 평균 크기를 구하고 이의 상대적인 수치들을 그래프로 표시하였다.

Western blotting

배양 세포에 UVB (200 J/m²)를 조사하고 다양한 농도의 fisetin을 48 시간 처리한 후 세포를 모아 용해시킨 세포의 단백질을 10% SDS-PAGE 방법에 따라 분리시킨 후 transfer buffer (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 20% methanol)

에서 90 V, 60 분간 nitrocellulose 막에 옮기고 blocking 용액 (5% 탈지유가 들어있는 TBS buffer (1.36 M NaCl, 0.03 M KCl, 0.25 M Tris)에 1 시간 정도 방치한 후 TBST buffer (1.36 M NaCl, 0.03 M KCl, 0.25 M Tris, 0.1% Tween 20)에서 20 분간 세척하였다. p53이나 PCNA에 대한 항체 (Santa Cruz, 미국)가 들어있는 항혈청을 1% 탈지유가 들어있는 TBS buffer에 1:1,000으로 희석한 용액을 처리하여 실온에서 1 시간 동안 서서히 흔들어 준 다음 TBST buffer에서 20 분간 세척하였다. 이차항체를 1% 탈지유가 들어있는 TBS buffer에 1:2,000으로 희석한 용액을 처리하여 실온에서 30 분간 서서히 흔들어준 후 TBST buffer에서 20 분간 세척하였다. WEST-ZOL™ puls (iNtRON biotechnology), substrate solution : enhancer solution (1:1)에서 1 분간 반응시킨 후 암실에서 Hyper film (Amersham)을 얹어 3분에서 10분간 노출시킨 후 현상하였다. 현상 후 densitometer에 의해 스캔하여 밴드들의 양적 수준을 측정하고, 각 실험군에서 거의 일정하게 나타나는 beta actin의 수준(결과의 그림에서 생략함)에 대한 상대값들을 각각 구한 후, 이 값들을 대조군에 대한 상대적인 수준으로 변환하여 그래프로 제시하였다. 자외선 조사 후 다양한 시간동안 정상 배지로 배양한 실험군들과 자외선 조사 후 fisetin 처리군들 간의 단백질 수준에 대한 통계적 유의성은 Student's *t* test 방법에 의해 결정되었다.

결 과

자외선 조사에 의한 NIH3T3 세포의 핵분절에 대한 fisetin의 효과

UVB에 의한 세포고사가 진행될 때 나타나는 핵의 분절 현상을 관찰할 수 있는 DAPI 염색 분석을 수행하였다(Fig. 1). 세포에 UVB를 조사한 후 48 시간동안 배양배지에서만 배양한 세포(Fig. 1의 fisetin 0 μ M)은 세포고사의 특징적인 핵의 분절이 50% 정도로 측정되었다. 그러나 자외선 조사 후 fisetin을 여러 농도(50 - 500 μ M)로 첨가하여 48 시간 배양한 세포에서는 핵의 분절이 현저히 감소되었는데 특히 100 μ M fisetin 처리군에서는 핵의 분절이 10% 정도로 감소되었다(Fig. 1의 회색 막대). Fisetin 자체로도 농도증가에 따른 핵분절의 증가(Fig. 1의 흰 막대)가 관찰되므로 자외선 조사의 효과와 fisetin의 효과가 독립적으로 더해졌을 때 기대되는 효과(점선)와 비교하면 fisetin이 UVB에 의한 NIH3T3 세포의 세포고사로부터 보호하는 효과가 상당함을 나타내는 것으로 생각된다.

자외선 조사에 의한 NIH3T3 세포의 DNA 단사절단에 대한 fisetin의 효과

UVB에 의한 DNA 상해를 회복하는 과정중의 DNA 단사

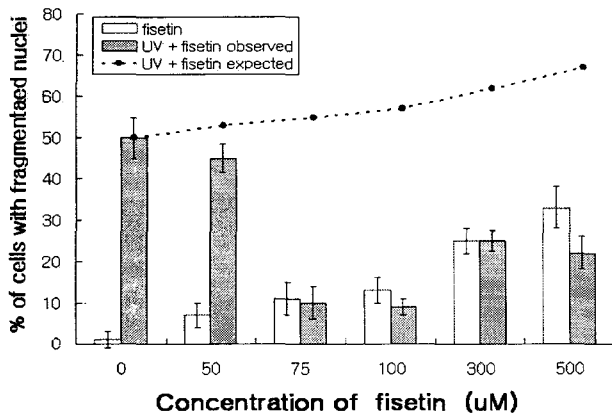


Fig. 1. Protective effect of fisetin on UVB-induced nuclear fragmentation in NIH3T3 cells. Cells exposed to 200 J/m² UVB light (grey bars) or vehicle (white bars) were postincubated for 48 h with growth medium containing various concentrations of fisetin (0-500 μM) followed by DAPI staining. Each data point represents the mean ± SD of the percentage of cells with apoptotic nuclear fragmentation determined from triplicate experiments. Circles represent the expected values when the effects of UV and fisetin are independent.

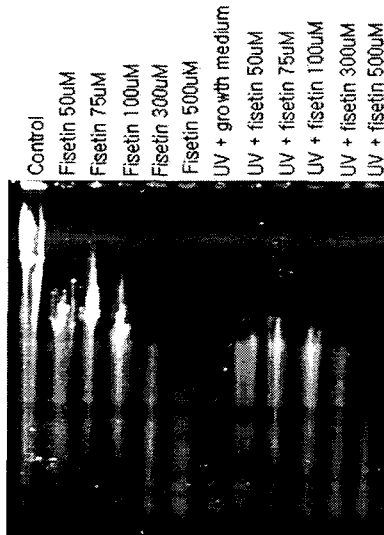
절단의 양적 변화는 그 시간동안 남아 있는 DNA 상해의 수준과 상관성을 보인다. DNA 단사절단을 측정하기 위해 알칼리에 노출된 상태로 전기영동(Fig. 2A)한 후 각 밴드의

DNA 크기 분포의 평균치를 구하고 정상 대조군에 대한 상대치를 구하여 도식화하였다(Fig. 2B). Fisetin 자체로도 어느 정도의 DNA 사절단이 유발되는 효과가 관찰되었으나 자외선 조사후 정상 배지에서 48 시간 배양한 세포는 정상대조군에 비해 약 10% 이하로 DNA 크기가 감소됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 흥미롭게도 자외선 조사 후 48 시간 배양시 fisetin이 다양한 농도로 포함되었을 경우 자외선과 fisetin이 독립적으로 작용하여 DNA 크기를 감소할 것으로 예상하는 수준(Fig. 2B의 점선)보다 유의한 수준 ($p < 0.05$)에서 더 큰 DNA 분포를 보였다. 이는 fisetin이 자외선 조사에 의해 발생된 DNA 상해를 효과적으로 회복하도록 작용하여 그 시간에 남아있는 DNA 단사절단의 빈도를 감소시켜 DNA 크기를 증가시킨 것으로 생각할 수 있었다.

p53 단백질의 발현에 대한 fisetin의 효과

UVB에 의해 유도되는 세포고사에 깊은 관련이 있는 것으로 알려진 p53 단백질의 발현이 fisetin에 의해 어떠한 변화를 보이는지 관찰하기 위해 Western blot 분석을 수행하였다(Fig. 3). 세포에 fisetin을 농도별(0, 50, 100, 300 μM)로 첨가하여 48 시간 반응시킨 세포(Fig. 3A, lanes 1-4)에서 p53 단백질의 발현은 거의 일어나지 않았다. 한편, 세포에 UVB를 조사한 후 배양배지만을 처리한 세포(Fig. 3A, lane 5)에서는 p53 단백질이 뚜렷하게 발현한 것을 볼 수 있었다. 그러나

A



B

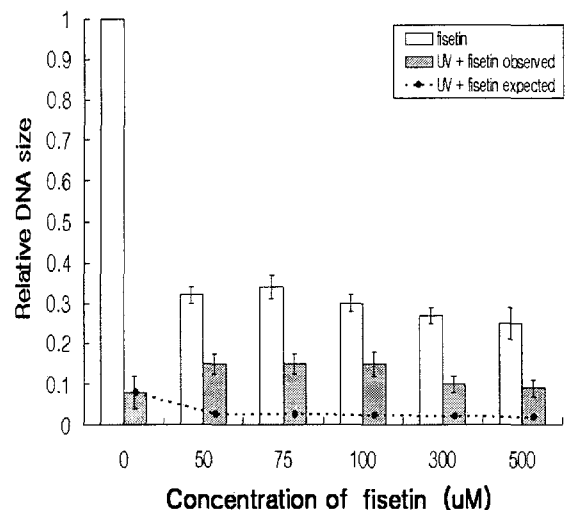


Fig. 2. Analysis by alkaline gel electrophoresis of DNA single strand breaks induced by UVB in NIH3T3 cells. (A) Cells were exposed to 200 J/m² UVB light or vehicle and postincubated for 48 h with growth medium containing various concentrations of fisetin. Cells were then embedded in agarose, lysed, and electrophoresed under alkaline conditions. After electrophoresis, the gel was neutralized, stained with ethidium bromide, and photographed under UV transillumination. (B) DNA size index of cells exposed to 200 J/m² UVB light (grey bars) or vehicle (white bars) and postincubated for 48 h with growth medium containing various concentrations of fisetin (0-500 μM). Each data point represents the mean ± SD of triplicate experiments. Circles represent the expected values when the effects of UV and fisetin are independent.

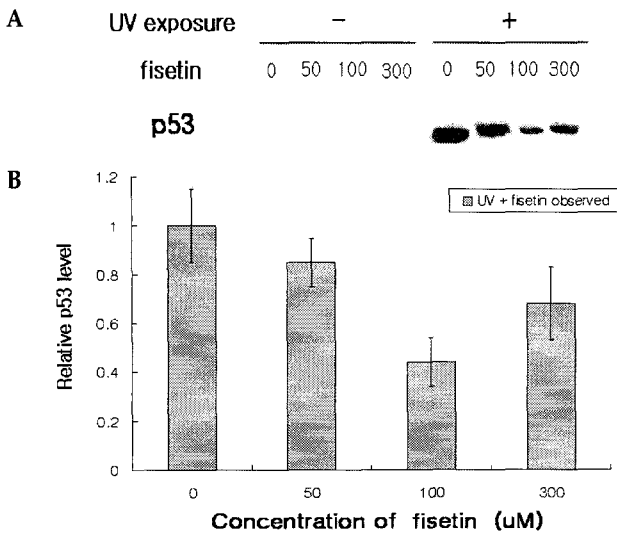


Fig. 3. Effect of fisetin postincubation on the expression level of p53 protein in NIH3T3 cells exposed to UVB light. (A) UVB (200 J/m²)-exposed cells were postincubated with growth medium, medium containing fisetin (0-300 µM) for 48 h. Each blot is the representative of three similar experiments. (B) p53 level index of cells exposed to 200 J/m² UVB light (grey bars) and postincubated for 48 h with growth medium containing various concentrations of fisetin (0-300 µM). Each data point represents the mean±SD of triplicate experiments.

UVB를 조사한 후 fisetin을 농도별(50, 100, 300 µM)로 첨가하여 48 시간 반응시킨 세포(Fig. 3A, lanes 6-8)에서의 p53 단백질의 발현은 UVB를 조사한 후 배양배지만을 처리한 세포보다 15-35% 정도 감소되는 것을 보였다(Fig. 3 B). 이는 fisetin이 UVB에 의한 세포고사를 저해하는 효과를 보이는 것으로 생각된다.

PCNA 단백질의 발현에 대한 fisetin의 효과

세포주기의 진행에 관련되는 PCNA 단백질의 발현이 자외선에 의해 어느 정도 감소되고 이것이 fisetin 후처리에 의해 어느 정도 방어되는지 관찰하기 위해 Western blot 분석을 수행하였다(Fig. 4). 세포에 fisetin 자체만을 48 시간 처리한 그룹 (Fig. 4A, lanes 1-4)에서 PCNA 단백질의 발현을 분석한 결과, fisetin을 고농도로 처리 하였을 때는 세포독성의 영향으로 PCNA 수준이 점차 감소함을 알 수 있었다. 한편, 세포에 UVB를 조사한 후 배양배지만을 처리한 세포(Fig. 4A, lane 5)에서 PCNA 단백질의 발현은 현저히 감소하였는데 이는 UVB에 의한 DNA 상해의 영향으로 인해 세포 주기의 진행의 방해 및 이에 연관된 세포분열의 감소에 기인한 것으로 보인다. 그러나 세포에 UVB를 조사한 후 fisetin을 농도별(50, 100, 300 µM)로 첨가하여 48 시간 반응시킨 세포 (Fig. 4A, lanes 6-8)에서의 PCNA 단백질의 발현은 UVB를

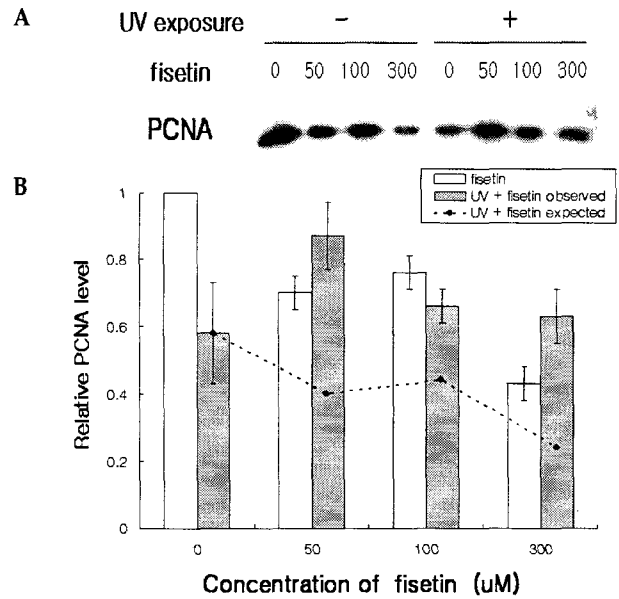


Fig. 4. The effect of fisetin postincubation on the expression level of PCNA protein in NIH3T3 cells exposed to UVB light. (A) UVB (200 J/m²)-exposed cells were postincubated with growth medium, medium containing fisetin (0-300 µM) for 48 h. Each blot is the representative of three similar experiments. (B) PCNA level index of cells exposed to 200 J/m² UVB light (grey bars) or vehicle (white bars) and postincubated for 48 h with growth medium containing various concentrations of fisetin (0-300 µM). Each data point represents the mean ± SD of triplicate experiments. Circles represent the expected values when the effects of UV and fisetin are independent.

조사한 후 배양배지만을 처리한 세포보다 발현율이 25-45% 정도 증가하는 것을 보았다(Fig. 4B). 이는 UVB 조사에 의한 DNA 상해 및 이에 의한 세포고사가 fisetin의 후처리에 의해 감소되어 세포들의 생존을 증가하고 DNA 복제 및 회복과 관련된 PCNA 단백질이 활성화되었기 때문이라 생각된다.

고 찰

자외선, 특히 290-320 nm의 파장을 지닌 UVB는 우리 주위환경에 존재하며 UVB에 의해 유도되는 생물학적인 반응에는 세포주기 정지, 세포고사, 세포증식 그리고 어린피부세포의 노화 등이 포함되며, 대부분의 포유동물세포는 UVB와 같은 상해원에 지속적으로 노출될 때 종양의 발달을 유도한다[10,16,18].

우리들의 지난 연구에서 UVB에 의한 세포고사가 옥추출물 및 이의 분리 성분인 fisetin 후처리에 의해 저해됨을 규명하였다[13]. 본 연구에서는 UVB에 의한 세포고사뿐 아니라 DNA 회복의 정도를 반영하는 DNA 단사절단과 DNA 상해

반응에 민감한 p53 및 PCNA 단백질의 수준들과 연관하여 실험을 수행하였다.

UVB를 조사한 fisetin을 후처리한 세포의 세포고사 과정 중 나타나는 핵의 분절은 정상 배지로만 배양하였을 경우보다 통계적으로 유의적인 감소를 보였다(Fig. 1). 이는 UVB에 의한 세포고사를 fisetin이 저해하고 세포의 생존을 보호해주는 효과가 있음을 시사한다. 이러한 fisetin에 의한 세포 고사로부터의 보호효과는 fisetin이 DNA 회복에 관여하여 DNA 상해의 잔존 수준을 낮추는 효과가 있음이 추론되었고, 따라서 DNA 단사 절단 분석을 수행하게 되었다. 분석 결과 자외선 조사후 fisetin 처리는 정상배지 배양과 비교하여 DNA 크기의 평균값을 증가시키는데 공헌함을 알 수 있었는데(Fig. 2), 이는 fisetin이 단순히 세포고사의 지연이나 저해뿐 아니라 DNA 회복 과정 자체에 관여하여 DNA 상해의 수준을 낮추는데 기여하는 것으로 생각된다.

DNA 상해에 의한 세포고사에 의해 발현하게 되는 단백질에는 p53, Bax, Mdm2, Gadd45이 포함되고 DNA 회복과 연관 있는 단백질은 PCNA, 세포주기와 연관 있는 단백질은 cyclin A, cyclin D, cdk2, cdk4가 발현하게 된다[14]. p53 단백질은 자외선과 같은 DNA 상해가 일어난 후 세포주기를 조절해 주는 중요한 단백질로[12], 유전독성에 의해 활성화되고 발현율이 증가한다[24]. 세포주기를 정지하거나 세포고사를 진행하는데 있어서 필요한 p53 단백질은 핵 안에 안정화된 p53 단백질이 축적되어야 그 기능을 한다고 알려져 있다[20]. p53의 활성화 증가에 의해 활성화된 p21은 cyclin/CDK 복합체와 결합하여 이들의 인산화 효소 기능을 저해함으로써 세포주기의 진행을 멈추고 DNA 회복또는 세포고사 과정을 준비하는 시간을 벌어주는데 기여하는 것으로 알려져 왔다[4,16].

본 연구에서는 UVB 조사후 fisetin의 처리가 p53의 감소와 PCNA의 증가에 기여함을 제시하였다. 특히 p53의 감소는 통계적 유의성을 충분히 확보함으로써 fisetin이 DNA 상해의 수준을 감소시켜 p53이 요구되는 세포고사 과정을 감소시켰음을 시사한다. Fisetin의 이러한 효과가 플라보노이드 중의 하나인 silibinin에 대해 보고되었는데, silibinin이 자외선 상해시 활성화되는 p53의 수준을 증가시키고, 그로 인해 p21^{WAF1}이 활성화되며 그 p21^{WAF1}은 PCNA와 DNA 합성을 저해시켜 결국은 세포의 증식을 저해시키고 UVB에 의한 피부종양을 억제한다고 제시되었다[15]. 본 연구에서는 단지 PCNA의 약간의 증가가 관찰되는데 이는 실험의 설계와 세포 유형의 차이에서 기인될 수도 있으며 보다 구체적인 기작에 대한 연구가 필요하다.

요 약

본 연구에서는 UVB에 조사된 NIH3T3 세포에서 세포고

사와 DNA 단사절단에 미치는 fisetin 후처리의 효과에 대해서 연구하였다. 세포에 UVB (200 J/m²)를 조사하고 정상배지에서 48시간 배양한 세포의 세포고사에 수반되는 핵분절은 50% 정도의 세포에서 관찰되었다. 흥미롭게도 배양배지에 fisetin이 첨가될 경우 핵분절을 보이는 세포의 빈도는 상당한 감소를 보였다. 알칼리 아가로스 겔에 의한 DNA 단사절단 분석에서 자외선 조사 후 fisetin 처리는 정상배지 배양시보다 단사절단의 빈도를 감소시켜 DNA 크기의 증가를 유도하였는데 이는 fisetin이 UVB에 의한 DNA 상해의 회복에 긍정적 효과를 나타냄을 시사한다. Western blot 분석에 의해 fisetin은 자외선 조사에 의해 활성화되는 p53의 수준을 유의한 수준으로 감소시키며 자외선 상해의 결과 세포주기의 정지에 수반되는 PCNA의 감소 경향을 다소 완화시켰다. 이러한 결과들은 fisetin이 DNA 회복의 활성을 통해 세포고사의 감소에 기여하며 이 과정에서 p53 및 PCNA의 수준변화와 관련하여 행동함을 시사한다.

감사의 글

“이 논문은 원광대학교 2004년도 교비연구지원에 의하여 연구되었음”

참 고 문 헌

1. Courdavault, S., C. Baudouin, M. Charveron, B. Canguilhem, A. Favier, J. Cadet and T. Doukia. 2005. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair* 4, 836-844.
2. D'Errico, M., T. Lemma, A. Calcagnile, L. P. De Santis and E. Dogliotti. 2006. Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. *Mutat. Res.* in press.
3. Dashwood, R. and D. Guo. 1993. Antimutagenic potency of chlorophyllin in the Salmonella assay and its correlation with binding constants of mutagen-inhibitors complex. *Environ. Mol. Mutagenesis* 22, 164-171.
4. El-Deiry, W. S. 1998. Review: The p53 pathway and cancer therapy. *The Cancer J.* 11, 229-236.
5. Fotedar, R., M. Bendjennat and A. Fotedar. 2004. Role of p21WAF1 in the cellular response to UV. *Cell Cycle* 3, 134-139.
6. Guengerich, F. P. 1989. Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 48, 2946-2954.
7. Hayatsu, H., N. Inada, T. Kakutani, S. Arimoto, T. Negishi, K. Mori, T. Okuda and I. Sakata. 1992. Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. *Prevent. Med.* 21, 370-376.
8. Hwang, S. J., J. S. Lee, B. H. Jeon, W. S. Kim, E. R. Woo and J. K. Park. 2002. Extracts of *Caesalpinia sappan* L potent

- tiate the apoptosis of NIH3T3 cells exposed to MMS. *Kor. J. Life Sci.* **12**, 182-187.
9. Hwang, S. J., J. Y. Cha, S. G. Park, G. J. Joe, H. M. Kim, H. B. Moon, S. J. Jeong, J. S. Lee, D. H. Shin, S. R. Ko and J. K. Park. 2002. Diol and triol type ginseng saponins potentiate the apoptosis of NIH3T3 cells exposed to MMS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **181**, 192-202.
 10. Ichihashi, M. M. Ueda, A. Budiyo, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru and T. Horikawa. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology* **189**, 21-39.
 11. Kadekaro, A. L., R. J. Kavanagh, K. Wakamatsu, S. Ito, M. A. Pipitone and Z. A. Abdel-Malek. 2003. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: Who will win the final round? *Pigment Cell Res.* **16**, 434-447.
 12. Kawagishi, N., Y. Hashimoto, H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto and H. Iizuka. 1998. Epidermal cell kinetics of pig skin in vivo following UVB is enhanced in hyperproliferative skin condition. *J. Dermatol. Sci.* **18**, 43-53.
 13. Kim, D. Y., E. H. Hwang and J. K. Park. 2005. Effect of *Rhus verniflua* Stokes extract and fisetin on UVB-induced apoptosis in NIH3T3 cells. *Kor. J. Life Sci.* **15**, 141-146.
 14. Li, Y., M. Chopp, C. Powers and N. Jiang. 1997. Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res.* **765**, 301-312.
 15. Mallikarjuna, G., S. Dhanalakshmi, R. P. Singh, C. Agarwal and R. Agarwal. 2004. Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling. *Cancer Res.* **64**, 6349-6356.
 16. Matsumura, Y. and H. N. Ananthaswamy. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 298-308.
 17. McGowan, C. H. and P. Russell. 2004. The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 629-633.
 18. Ouhtit, A., H. K. Muller, D. W. Davis, S. E. Ullrich, D. McConkey and H. N. Ananthaswamy. 2000. Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. *Am. J. Pathol.* **156**, 201-207.
 19. Read, M. A. 1995. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agent. *Am. J. Pathol.* **147**, 235-237.
 20. Renton, A., S. Llanos and X. Lu, 2003. Hypoxia induces p53 through a pathway distinct from most DNA-damaging and stress-inducing agents. *Carcinogenesis* **24**, 1177-1182.
 21. Sawyer, D. E., Mercer, B. G., Wiklendt, A. M. and Aitken, R. J. 2003. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutation Res.* **529**, 21-34.
 22. Szu ts1, D., C. Christov, L. Kitching and T. Krude. 2005. Distinct populations of human PCNA are required for initiation of chromosomal DNA replication and concurrent DNA repair. *Exp. Cell Res.* **311**, 240-250.
 23. Wu, C. H. and G. C. Yen. 2004. Antigenotoxic properties of *Cassia* tea (*Cassia tora* L.): Mechanism of action and the influence of roasting process. *Life Science* **76**, 85-101.
 24. Xu, J. and Morris, G. F. 1999. p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation. *Mol. Cell. Biology.* **19**, 12-20.
 25. Yen, G. C., D. Y. Chuang and C. H. Wu. 2002. Free radicals in foods: Chemistry, nutrition and health effects. In: Morello, M. J., F. Shahidi, and C. T. Ho (Eds), ACS Symposium Series No. 807, Washington DC, pp. 201-212.