

엘라스타제를 이용한 주름개선 후보물질 검색 시스템의 구축

오 미 희 · 이 주 은 · 김 수 연 · 김 소 영 · 박 경 찬* · 윤 혜 영 · 백 광 진 · 권 년 수 · 김 동 석[†]

중앙대학교 의과대학 생화학교실, *서울대학교 의과대학 피부과학교실
(2009년 2월 10일 접수, 2009년 3월 2일 수정, 2009년 3월 5일 채택)

Screening System Establishment for Potential Anti-wrinkle Agents Using Human Fibroblast Elastase

Mi Hee Oh, Ju Eun Lee, Su Yeon Kim, So Young Kim, Kyoung Chan Park*, Hye Young Yun, Kwang Jin Baek, Nyoun Soo Kwon, and Dong Seok Kim[†]

Department of Biochemistry, College of Medicine, Chung-Ang University, 221, Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

*Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine,
(Received February 10, 2009; Revised March 2, 2009; Accepted March 5, 2009)

요약: 피부주름 개선에는 콜라겐(collagen)뿐만 아니라 탄력섬유인 엘라스틴(elastin) 등도 기여하는 것으로 보고되고 있다. 더 나아가 자외선에 의하여 사람의 피부에서 광노화 현상이 나타나며 자외선 조사 후 엘라스타제(elastase)의 활성이 증가하기 때문에 엘라스타제의 활성증가는 자외선에 의한 피부 탄성도의 감소 및 주름 생성의 주요원인으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 피부주름 생성에 영향을 미치는 엘라스타제의 활성을 측정하기 위한 모델을 마련하기 위하여 시판되는 두 가지 엘라스타제, 돼지 췌장 엘라스타제(porcine pancreatic elastase)와 사람 호중구 엘라스타제(human neutrophil elastase)를 사용하였으며 다음 세 가지는 정상 사람 섬유아세포(normal primary human fibroblasts), 쥐의 3T3 섬유아세포주(3T3 mouse fibroblasts), 사람의 CCD-25Sk 섬유아세포주(CCD-25Sk human fibroblasts)로부터 elastase를 준비하여 사용하였다. 준비된 5가지 효소의 농도에 기질의 농도 및 배양시간에 따르는 효소의 활성을 비교 평가하였다. 양성대조군으로 사용한 phosphoramidon이 normal human primary fibroblast elastase와 CCD-25Sk fibroblast elastase의 활성을 유의성 있게 억제한 반면에 porcine pancreatic elastase에는 별다른 영향을 미치지 못하였다. 따라서 주름 개선 후보물질 탐색을 위한 엘라스타제의 선정에는 신중한 고려가 필요할 것으로 사료된다.

Abstract: It has been reported that not only collagen but also elastin contribute to inhibit skin wrinkle formation. Ultraviolet (UV) radiation induces photo-aging on human skin. Because UV radiation increases elastase activity, it is thought that increased elastase activity could be the major reason for skin elasticity reduction and wrinkle formation by UV. In the present study to standardize elastase activity measuring system, purified elastases from porcine pancreas and human neutrophil, and cell extracts of normal human primary fibroblasts, 3T3 mouse fibroblasts, and CCD-25Sk human fibroblasts were used as various enzyme sources. Furthermore, elastase activities were compared according to concentrations of enzyme and substrate and incubation time. Phosphoramidon was used as a positive control to inhibit elastase activities of normal human primary fibroblasts and CCD-25Sk fibroblasts. However, it had no influence on the activity of porcine pancreatic elastase. Therefore, it is suggested that elastase used for testing anti-wrinkle agents should be selected carefully.

Keywords: human fibroblast, elastase, elastin, aging, wrinkle

[†] 주 저자 (e-mail: ds_kim@cau.ac.kr)

1. 서 론

세계적으로 고령인구의 증가와 경제수준의 향상에 따라 주름개선을 필두로 하는 피부노화방지에 대한 관심이 높아지고 있는 추세이다. 따라서 다양한 접근 방법을 가지고 항노화 화장품을 개발하려는 여러 가지 영역에서 활발한 연구가 진행되고 있다. 이 연구 분야들을 살펴보면, 콜라겐 생성의 증가 및 분해의 억제[1], 엘라스틴의 생성촉진 및 분해억제[2], 히아루론산(hyaluronic acid) 생성증가[3], 노화 세포재생 촉진[4], 반응성 산소라디칼(reactive oxygen species, ROS) 제거[5] 등이다.

피부에 탄력을 주어 피부의 주름을 완화 또는 개선하는 기능을 하는 화장품을 주름개선 기능성화장품이라고 한다. 주름개선 화장품의 수요증가에 따라 우수한 화장품의 개발에 많은 연구자들이 연구를 집중하고 있으나 임상에서 뚜렷한 효과를 나타내는 원료는 미미한 실정이다.

주름개선 기능성 화장품으로 쓰이는 식품의약품안전청의 고시 원료로는 레티놀(retinol), 아데노신(adenosine) 등의 성분들이며, 이들 성분을 함유한 제품들이 주름개선의 효과를 보이는 것으로 알려져 있다[6,7]. 이들 성분들은 세포 내 콜라겐의 생성을 증가시키거나 또는 콜라겐을 분해하는 효소인 콜라게나제(collagenase)의 활성을 억제시킨다고 알려져 있다. 그러나 연구개발의 어려움과 유효성 평가에 대한 기준의 개선이 절실한 시점에서 현재 국내의 연구동향을 살펴보면 새로운 기능성 원료의 개발 보다는 기존 원료의 안정화나 피부 흡수 개선에 주력하고 있는 실정이다.

최근의 연구에서 섬유아세포에서 유래한 엘라스타제가 피부탄성섬유의 3차원적 뒤틀림에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있으며 이러한 엘라스타제의 활성증가는 피부의 탄력섬유를 감소시킴으로써 피부 주름 형성에 기여한다고 알려져 있다[8]. 더 나아가 자외선에 의하여 사람의 피부에서 광노화현상이 나타나며 자외선 조사후 엘라스타제의 활성이 증가하기 때문에 엘라스타제의 활성 변화는 자외선에 의한 피부 탄성도의 감소 및 주름 생성의 주요원인으로 생각된다[9].

콜라겐 생성의 증가가 피부주름 개선에 주된 요소임은 분명하나 콜라겐 이외에 탄력섬유인 엘라스틴 등도 주름 개선에 크게 기여하고 있다고 보고되고 있다[10]. 따라서 콜라겐의 생성 증가효과나 분해 억제효과만을 기능성 화장품의 유효성 평가방법으로 사용하는 데에는 무리가 있으며, 새로운 평가기준의 개발이 시급한 실정이다. 그러므로 세계적으로 콜라겐뿐만이 아니라 엘라스틴의 생성

과 분해에 대한 관심이 고조되고 있으므로[11,12] 엘라스틴 및 관련효소를 이용한 주름개선 후보물질의 탐색은 주름개선 기능성화장품뿐만 아니라 주름개선용 의약품을 개발하는데 기여할 것이다.

따라서 본 연구에서는 섬유아세포에서 엘라스틴의 조절 측정에 가장 적절한 방법을 제시하며 엘라스타제의 활성을 조절하여 엘라스틴의 분해를 억제하고 탄력적인 피부의 유지 및 생성에 도움을 줄 수 있는 후보물질을 발굴하는데 도움을 주고자 하였다. 구체적으로 피부주름 생성에 영향을 미치는 엘라스타제의 활성을 측정하기 위한 모델을 마련하기 위하여 시판되는 2가지 엘라스타제 즉, 돼지 췌장 엘라스타제(porcine pancreatic elastase, EC 3-4-21-36)와 사람 호중구 엘라스타제(human neutrophil elastase, EC 3-4-21-37)를 사용하였으며 또 정상 사람의 섬유아세포(normal human fibroblasts), 쥐의 3T3 섬유아세포주(3T3 mouse fibroblasts), 사람의 CCD-25Sk 섬유아세포주(CCD-25Sk human fibroblasts) 등의 서로 다른 3종류의 세포에서 추출된 엘라스타제(EC 3-4-24)를 사용하여 각 효소의 농도에 따른 기질의 농도 및 배양시간에 따르는 효소의 활성을 비교 평가하였다.

2. 실험 방법

2.1. 시 약

돼지 췌장 엘라스타제(porcine pancreatic elastase) 및 사람 호중구 엘라스타제(human neutrophil elastase)는 Sigma (MO, USA)에서 구매하여 준비하였다. 엘라스타제의 억제제인 phosphoramidon은 Boeringer Mannheim (Germany)에서 구입하였고, 엘라스타제의 합성 기질인 STANA (*N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide)는 Peptide Institute Inc. (Japan)에서 구입하였다. 이외의 사용된 다른 시약들은 Sigma에서 구매하였다.

2.2. 세포 배양

정상 사람의 섬유아세포(normal human primary fibroblasts)는 어린아이의 포경수술을 통하여 얻어진 포피에서 분리하였다. 상피 포피의 피부조직에서 잔여 피하지방을 제거 후 잘게 절개하여 티모라이신(thermolysin) 용액(Sigma, USA)에서 37 °C에서 1 h 동안 반응시켰다. 분리된 섬유아세포는 10 % 우태아혈청(FBS) 50 µg/mL의 스트렙토마이신 및 50 U/mL의 페니실린이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WelGENE, Daegu, Korea)에서 배양하였다.

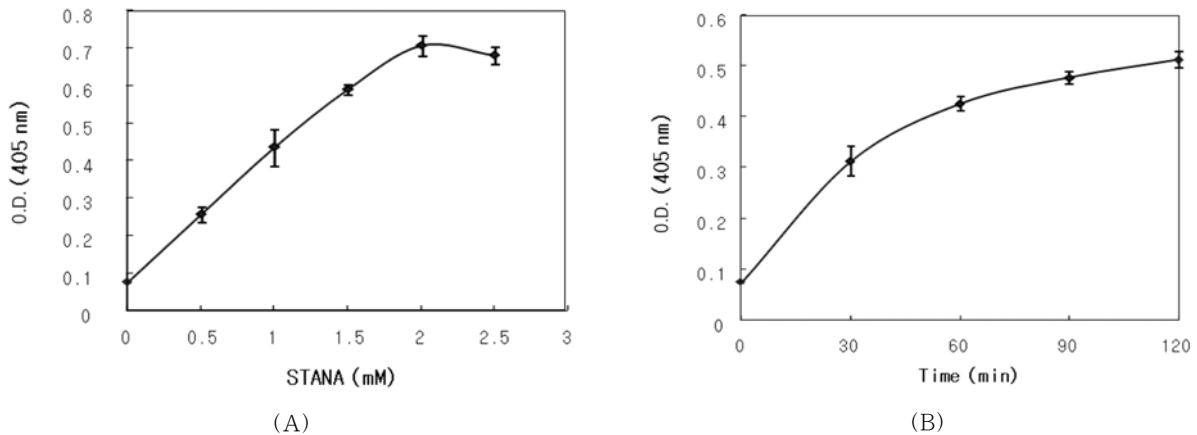


Figure 1. (A) Substrate concentration dependency of pancreatic elastase activity, (B) Time dependency of pancreatic elastase activity.

위의 3T3 섬유아세포주(3T3 mouse fibroblasts)와 사람의 CCD-25Sk 섬유아세포주(CCD-25Sk human fibroblasts)는 American type culture collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 5 %의 CO₂ 37 °C 하에서 10 %의 FBS, 50 µg/mL의 스트렙토마이신 및 50 U/mL의 페니실린을 첨가한 DMEM에서 배양하였다.

2.3. 엘라스타제의 활성도 측정

엘라스타제 활성의 측정을 위하여 엘라스타제는 porcine pancreatic elastase, human neutrophil elastase 등의 정제된 효소뿐만이 아니라 normal human fibroblasts 및 3T3 mouse fibroblasts와 CCD-25Sk human fibroblasts로부터 추출한 효소 추출액을 다양한 농도로 실험하였다.

Normal human primary fibroblasts 및 3T3 mouse fibroblasts와 CCD-25Sk human fibroblasts는 각각의 배양된 세포에 1 % triton X-100이 포함된 0.1 M 인산완충액 (pH 6.8)을 첨가한 후 초음파 분쇄기를 통하여 녹인 다음 10,000 rpm에서 5 min 동안 원심 분리하여 엘라스타제가 들어 있는 상층액을 취한 후, 이를 정량하여 총 단백질 양으로 효소의 활성을 상대 평가하였다.

효소 활성의 측정을 위하여 먼저 다양한 종류의 엘라스타제를 분주하여 여러 가지의 최종 농도가 될 수 있도록 stock용액을 만들고 이를 10 µL씩 96-well plates의 각 well에 넣은 후, 78 µL의 0.2 M Tris-HCl 완충액을 넣어 반응 조건을 만든 다음, 주름개선 후보물질을 다양한 농도로 10 µL씩 각 well에 넣어 효소 활성 반응을 준비한다. 여기에 반응을 시작시키기 위하여 엘라스타제의 특이적인 기질인 STANA (*N*-succinyl-(Ala)₃-*p*-nitroanilide,

50 mM)를 각 well 당 2 mL씩 넣어준다. 37 °C에서 배양하면서 매 30 min 마다 405 nm에서 흡광도를 측정하여 시험할 물질을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하여 상대적인 엘라스타제 활성도를 계산하였다. 양성대조군으로 섬유아세포 생성 엘라스타제의 특이적 억제제인 phosphoramidon을 사용하였다.

2.4. Data 통계처리

실험은 3번 이상 반복하여 평균값과 표준오차를 구하고 Student's *t*-test에 의하여 *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성 있는 것으로 평가하였다.

3. 결 과

3.1. 엘라스타제 활성 측정법의 최적화

엘라스타제 활성 측정법을 최적화하기 위하여 다양한 실험조건에서 실험을 진행하였다. 실험에 쓰인 효소는 상용화되어 쉽게 구매할 수 있는 porcine pancreatic elastase를 사용하였다. 효소의 농도는 일단 최종농도가 1 µg/mL이 되도록 고정하였다. 우선 적절한 기질 농도를 찾기 위하여 기질로 쓰인 STANA 50 mM을 96-well plates의 각 well 당 0 ~ 4 mM로 기질의 농도를 조절하면서 엘라스타제의 활성을 측정하였다(Figure 1A). 그 결과 STANA 50 mM을 2 mM 사용한 경우 반응이 정점에 올라 농도가 올라가도 더 이상 반응 속도가 빨라지지 않는 것을 관찰하였으며 STANA 1 mM의 농도에서 충분한 효소-기질 반응을 이끌어 내는 것을 알 수 있었다. 따라서 앞으로의 실험에서는 1 mM을 적정 기질 농도로 사용하였다. 다음으로 적절한 반응 시간을 찾기 위하여 30 min 간

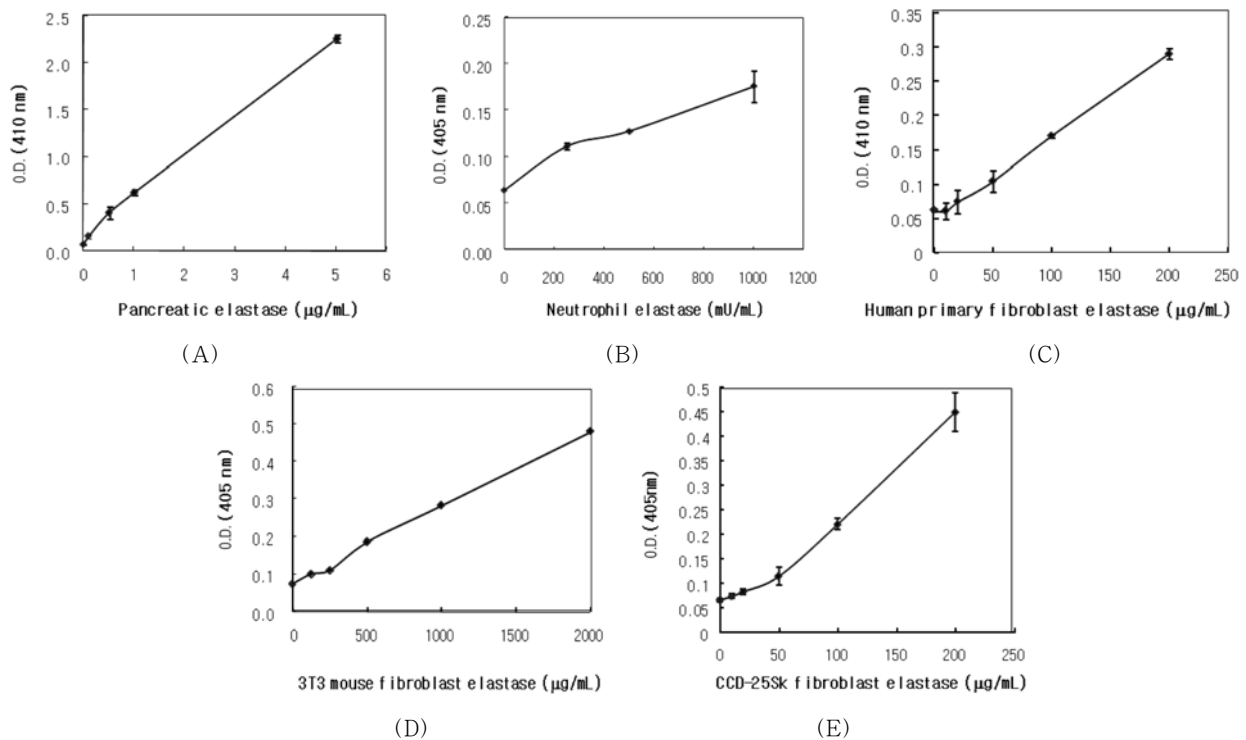


Figure 2. Concentration dependency of elastase activity in various originated elastase. (A) Porcine pancreatic elastase, (B) Human neutrophil elastase, (C) Human primary fibroblast elastase, (D) 3T3 mouse fibroblast elastase, (E) CCD-25Sk human fibroblast elastase.

격으로 활성을 측정 한 결과 적어도 120 min까지 지속적으로 반응을 지속하였으며 60 min까지는 반응의 속도가 급격히 증가하다가 60 min 이후에는 완만한 반응속도의 증가를 보였다(Figure 1B). 따라서 앞으로의 실험에서는 실험의 시간적 효율성을 생각하여 60 min을 반응 시간으로 설정하였다.

3.2. 여러가지 효소의 농도에 따르는 엘라스타제의 활성

엘라스타제의 활성 측정을 위한 여러 가지 다양한 효소의 적절한 농도를 결정하기 위하여 효소의 농도에 따르는 엘라스타제의 활성을 측정하였다. 먼저 정제된 효소들인 porcine pancreatic elastase와 human neutrophil elastase 모두 효소 농도가 높아짐에 따라 활성이 증가되는 양상을 보여 주었다(Figure 2A, B). 그러나 human neutrophil elastase는 porcine pancreatic elastase에 비하여 효소의 농도대비 활성이 그다지 높지 않았다. 따라서 앞으로의 실험에서 엘라스타제의 억제물질 시험에 정제된 효소를 사용하는 경우 porcine pancreatic elastase 1 $\mu\text{g/mL}$ 를 적정 효소 농도로 정하였다.

다음으로 세포 내의 엘라스타제의 원천으로 human primary fibroblast elastase의 추출액을 사용하는 것이 가

장 이상적이라고 할 수 있으나 사람의 섬유아세포는 일차 배양하는데 어려움이 있어 지속적으로 효소를 공급할 수 없다는 단점과 섬유아세포가 유래한 개개의 차이점을 간과할 수 없으므로 두 가지 섬유아세포주인 3T3 mouse fibroblast elastase과 CCD-25Sk human fibroblast elastase를 사용하여 human primary fibroblast elastase와 비교 실험하였다. 이들 세 가지 효소들 역시 효소의 농도가 증가함에 따라 그 활성도 농도의존적으로 증가함을 관찰할 수 있었다(Figure 2C, D, E). 그러나 3T3 mouse fibroblast elastase는 다른 두 효소와 비교하여 효소의 활성이 1/10 정도 수준 밖에 안 된다는 것을 알 수 있었으며, CCD-25Sk human fibroblast elastase는 human primary fibroblast elastase보다 조금 높은 활성을 나타내었다. 따라서 앞으로의 실험에서 CCD-25Sk human fibroblast elastase 총 단백질 기준 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 적정 농도로 사용하여 실험을 진행하였다.

3.3. 양성대조군인 Phosphoramidon이 엘라스타제 활성에 미치는 영향

사람 진피의 섬유아세포에서 만들어지는 엘라스타제의 억제제는 엘라스틴의 분해를 억제함으로써 주름의 생성

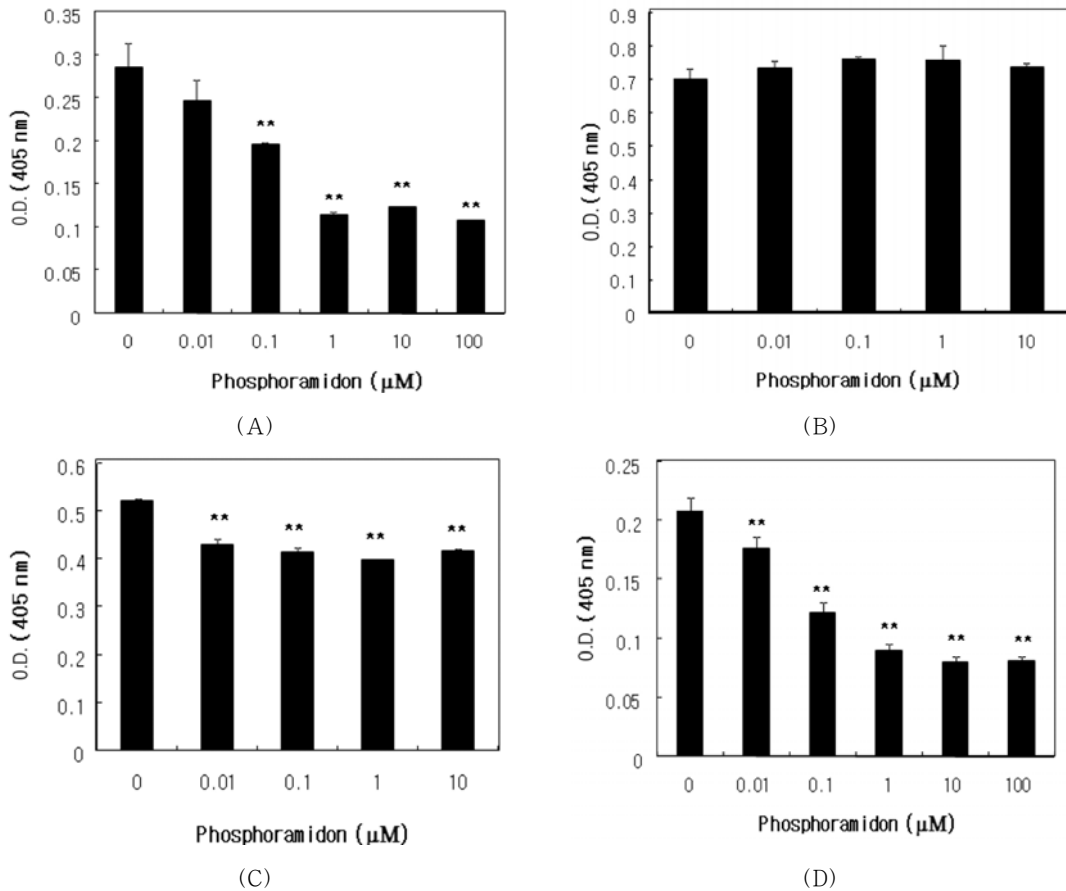


Figure 3. Effects of phosphoramidon on various elastase activity. (A) Normal human primary fibroblast elastase, (B) Porcine pancreatic elastase, (C) 3T3 mouse fibroblast elastase, (D) CCD-25Sk human fibroblast elastase. Each determination was made in triplicate and the data represent means \pm S.D. ****** $p < 0.01$ versus the untreated control.

를 저해한다고 알려져 있다. 따라서 사람의 섬유아세포에 대한 반응의 특이성을 확인하기 위하여 양성 대조군으로 사람 섬유아세포 생성 엘라스타제 억제제로 알려진 phosphoramidon이 다양한 종류의 엘라스타제의 억제에 미치는 영향을 조사하였다. 예측한대로 phosphoramidon은 normal human primary fibroblast elastase의 활성을 농도의존적으로 억제시켰다(Figure 3A). Phosphoramidon 0.01 μ M에서 약간의 엘라스타제 억제작용이 관찰되었으며 1 μ M의 농도에서 최상의 억제작용을 보였다. 흥미롭게도 phosphoramidon은 porcine pancreatic elastase의 활성에는 영향을 미치지 못하였다(Figure 3B). 3T3 mouse fibroblast elastase는 다른 섬유아세포 유래 두 효소와 비교하여 phosphoramidon에 의한 억제효과가 작다는 것을 알 수 있었으며 CCD-25Sk human fibroblasts에서는 phosphoramidon의 농도 의존적으로 엘라스타제 활성을 억제시켰으며 그 반응성은 normal human primary fibro-

blast elastase와 비슷하였다.

4. 고찰 및 결론

피부주름의 발생에는 콜라겐의 감소뿐만 아니라 탄력 섬유인 엘라스틴의 저하 등도 기여하는 것으로 보고되고 있다[2,10]. 더 나아가 반복적인 태양광에의 노출이나 자외선의 조사에 의하여 사람의 피부에서 광노화 현상이 나타나며 자외선 조사 후 엘라스타제의 활성이 증가하기 때문에 엘라스타제의 활성증가는 자외선에 의한 피부 탄성도의 감소 및 주름 생성의 주요원인으로 생각된다[11].

피부에는 크게 neutrophil elastase와 skin fibroblast elastase의 두 가지 종류의 엘라스타제가 존재한다고 알려져 있다[13]. 이러한 엘라스타제는 피부의 노화뿐만 아니라 염증과 다양한 피부질환에서도 중요한 역할을 한다. Neutrophil elastase는 특히 피부의 염증반응에서 혈

액의 neutrophil이 피부로 침투하면서 엘라스틴 조직에 영향을 미친다. 중요한 사실은 홍반이 발생하지 않는 용량의 UV를 쥐의 피부에 조사하였을 때에도 neutrophil이 피부로 침투하지 않으면서 주름이 발생한다는 사실이다 [14]. 이와 같은 사실은 피부의 섬유아세포에 있는 엘라스타제가 주름발생의 주요 원인이라는 점을 시사하여 준다.

엘라스타제는 크게 metalloproteinase계통과 serine protease계통의 효소로 나뉜다. Skin fibroblast elastase는 metalloproteinase계통에 속하는 반면 neutrophil elastase는 serine protease계통에 속한다[15,16]. 일반적으로 정제된 효소인 사람의 neutrophil elastase는 고가이고, skin fibroblast elastase는 정제하여 시판하지 않으므로 엘라스타제 활성의 측정에는 neutrophil elastase와 같은 serine protease계통인 porcine pancreatic elastase를 많이 사용하고 있다. 그러나 porcine pancreatic elastase 사용에 따르는 객관적인 타당성은 확립이 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 피부주름 생성에 영향을 미치는 엘라스타제의 활성을 측정하기 위한 모델을 마련하기 위하여 porcine pancreatic elastase, human neutrophil elastase 및 normal primary human fibroblasts, 3T3 mouse fibroblasts, CCD-25Sk human fibroblasts를 사용하여 효소의 농도, 기질의 농도 및 배양시간에 따르는 효소의 활성을 비교 평가하였다. 실험결과 human neutrophil elastase는 활성이 너무 낮아 주름개선을 위한 후보물질의 탐색에 적용하기에는 비경제적인 것으로 판단되었으며 3T3 mouse fibroblasts도 사람유래의 섬유아세포 엘라스타제에 비해 1/10 정도로 활성이 낮았으나 구하기 쉽다는 이점을 가지고 있었다.

이미 언급한 것처럼 사람의 섬유아세포 엘라스타제 주름발생의 주요 원인이므로 이 세포에 대한 반응의 특이성을 확인하기 위하여 양성 대조군으로 사람 섬유아세포 생성 엘라스타제의 특이적인 억제제로 알려진 phosphoramidon을 사용하였다[9]. Phosphoramidon은 친수성 rhamnose 잔기로 인하여 피부 흡수가 잘 되지 않아 실제로 주름개선을 위하여서는 사용이 되지 않지만 세포에서 뛰어난 효과를 발휘하므로 본 실험에서 여러 종류의 엘라스타제에 미치는 영향을 조사하였다.

실험결과 phosphoramidon은 metalloproteinase계통의 효소인 normal human primary fibroblast elastase 및 CCD-25Sk human fibroblasts의 활성을 농도의존적으로 억제시켰으나 serine protease계통의 효소인 porcine pancreatic elastase의 활성에는 영향을 미치지 못하였다. 따라서, 주름개선 물질의 탐색에 구입의 용이함 때문에 일반적으로 쓰이고 있는 porcine pancreatic elastase의 사용

은 재고되어야 할 것이다. 더 나아가 3T3 mouse fibroblast elastase는 다른 섬유아세포 유래 두 효소와 비교하여 phosphoramidon에 의한 반응 정도가 작았으며 앞에서 보여준 것처럼 효소의 활성 자체도 다른 두 효소에 비하여 작았기 때문에 구하기 쉽다는 이점에도 불구하고 이의 사용은 적절치 않다고 할 수 있다.

따라서 주름개선 후보물질을 탐색하는 엘라스타제 활성시스템에서 가장 이상적으로는 normal human primary fibroblast elastase을 사용하는 것이 적절하다 하겠으나 CCD-25Sk human fibroblasts에서도 phosphoramidon의 농도 의존적으로 엘라스타제 활성을 억제시켰으며 그 반응성은 normal human primary fibroblast elastase와 비슷하였기에 normal human primary fibroblast 배양의 어려움을 고려하면 CCD-25Sk human fibroblasts와 같이 사람 유래의 섬유아세포주를 사용하는 것이 대안으로 사용 가능할 것이다.

감 사

본 연구는 2007년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업의 연구비 지원(07082화장품262)에 의해 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. E. D. Son, J. Y. Lee, S. Lee, M. S. Kim, B. G. Lee, I. S. Chang, and J. H. Chung, Topical application of 17beta-estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating TGF-beta signaling in aged human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 1149 (2005).
2. S. Seite, H. Zucchi, D. Septier, S. Igondjo-Tchen, K. Senni, and G. Godeau, Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **20**, 980 (2006).
3. I. Ghersetich, P. Teofoli, M. Benci, and T. Lotti, Ultrastructural study of hyaluronic acid before and after the use of a pulsed electromagnetic field, electrolysis, in the treatment of wrinkles, *Int. J. Dermatol.*, **33**, 661 (1994).
4. I. Petropoulos and B. Friguet, Protein maintenance in aging and replicative senescence: a role for the peptide methionine sulfoxide reductases, *Biochem.*

- Biophys. Acta.*, **1703**, 261 (2005).
5. F. Hazane, K. Valenti, S. Sauvaigo, A. Peinnequin, C. Mouret, A. Favier, and J. C. Beani, Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays, *J. Photochem. Photobiol. B*, **79**, 171 (2005).
 6. O. Sorg, C. Antille, G. Kaya, and J. H. Saurat, Retinoids in cosmeceuticals, *Dermatol. Ther.*, **19**, 289 (2006).
 7. E. S. Chan, P. Fernandez, A. A. Merchant, M. C. Montesinos, S. Trzaska, A. Desai, C. F. Tung, D. N. Khoa, M. H. Pillinger, A. B. Reiss, M. Tomic-Canic, J. F. Chen, M. A. Schwarzschild, and B. N. Cronstein, Adenosine A2A receptors in diffuse dermal fibrosis: pathogenic role in human dermal fibroblasts and in a murine model of scleroderma, *Arthritis Rheum.*, **54**, 2632 (2006).
 8. K. Tsukahara, H. Nakagawa, S. Moriwaki, Y. Takema, T. Fujimura, and G. Imokawa, Inhibition of ultraviolet-B-induced wrinkle formation by an elastase-inhibiting herbal extract: implication for the mechanism underlying elastase-associated wrinkles, *Int. J. Dermatol.*, **45**, 460 (2006).
 9. K. Tsukahara, Y. Takema, S. Moriwaki, N. Tsuji, Y. Suzuki, T. Fujimura, and G. Imokawa, Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation, *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 671 (2001).
 10. F. Antonicelli, G. Bellon, L. Debelle, and W. Hornebeck, Elastin-elastases and inflamm aging, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **79**, 99 (2007).
 11. N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa, The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity, *Photochem. Photobiol.*, **74**, 283 (2001).
 12. F. Jimenez, T. F. Mitts, K. Liu, Y. Wang, and A. Hinek, Ellagic and tannic acids protect newly synthesized elastic fibers from premature enzymatic degradation in dermal fibroblast cultures, *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1272 (2006).
 13. G. Godeau and W. Hornebeck, Morphometric analysis of the degradation of human skin elastic fibres by human leukocyte elastase (EC 3-4-21-37) and human skin fibroblast elastase (EC 3-4-24), *Pathol. Biol. (Paris)*, **36**, 1133 (1988).
 14. D. B. Learn and S. J. Moloney, Numbers of murine dermal mast cells remain unchanged during chronic ultraviolet B irradiation, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **8**, 195 (1991).
 15. W. Hornebeck, J. M. Soleilhac, J. M. Tixier, E. Moczar, and L. Robert, Inhibition by elastase inhibitors of the formyl Met Leu Phe-induced chemotaxis of rat polymorphonuclear leukocytes, *Cell Biochem. Funct.*, **5**, 113 (1987).
 16. R. Hornsy, P. Pelletier-Lebon, J. M. Tixier, G. Godeau, L. Robert, and W. Hornebeck, Characterization of human skin fibroblasts elastase activity, *J. Invest. Dermatol.*, **91**, 472 (1988).