

감잎의 광노화 피부 개선에 미치는 효과(2)

이창현¹ · 김남석 · 최동성 · 오미진 · 마상용² · 김명순² · 유승정³ · 권진⁴ · 신현종¹ · 오찬호*

우석대학교 식품생명공학과, 1: 우석대학교 한의과대학, 2: 우석대학교 대체의학과, 3: 동상면사람들,
4: 한국복지대학교 의료보장구과

Effects of Persimmon leaf on the Photoaging Skin Improvement(2)

Chang Hyun Lee¹, Nam Seok Kim, Dong Seong Choi, Mi Jin Oh, Sang Yong Ma², Myoung Soon Kim²,
Seung Jeong Ryu³, Jin Kwon⁴, Hyun Jong Shin¹, Chan Ho Oh*

*Department of Food & Biotechnology, Woosuk University, 1: College of Korean Medicine, Woosuk University,
2: Department of Alternative Medicine, Woosuk University, 3: Dongsangmyunsaram Farming Cooperations,
4: Department of Prosthetics and Orthotics, Korea National College of Welfare*

This study was performed to investigate the anti-photoaging effects of Persimmon leaf tea(PLT) in hairless mice(SKH-1) exposed to UVB radiation. The animals were divided into non-treated group (normal, N) and UV-radiated groups. UV-radiated groups were divided into only UV-radiated group(control, C) and UV-radiated and PLT treated experimental groups[first extraction treated group(PLT-I), second extraction treated groupe(PLT-II), and third extraction treated group(PLT-III)]. Three PLT treated experimental groups of mice were treated with both oral administration(300mg/Kg B.W./day) and topical application (100 ul of 2% conc./mouse/day) for 4 weeks. Anti-photoaging effects of Persimmon leaf were evaluated by MTT assay, anti oxidative reaction, MMP immunohistochemistry, gelatin zymography assay and RT-PCR observations. Treatment with Persimmon leaf tea(PLT)-I, and -III groups decreased immunohistochemical density of matrix metalloproteinases(MMP)-3 and -9 related to degradation of extracellular matrix in skin. Especially, immunohistochemical density of MMP-2 decreased in PLT-I, -II and -III groups in skin. On the effects of antioxidant function on the treatment with Persimmon leaf tea(PLT), treatment of HaCaT cells with extracts of PLT-I and PLT-II had also significantly reduced intracellular ROS produced by UVB irradiation in a dose dependent manner(PLT-I, p<0.05, p<0.01, p<0.001; PLT-II, p<0.01, p<0.001). Gelatin zymography assay revealed that PLT-II and PLT-III (200 ug/ml) had inhibitory effect on MMP-9 expression in UVB-radiated HaCaT cells. Western blot analysis revealed that PLT-1, -II and -III groups down-regulates the expression of inflammatory associated genes(IL-1 β) and PLT-1 and -II groups down-regulates the expression of TNF- α in a dose dependent manner. Our study suggests that Persimmon leaf tea(PLT) extracts participates in inhibitory effects on the morphological and molecular experiments related to photoaging skin on UVB irradiated hairless mice.

Key words : Anti-photoaging, persimmon leaf, hairless mice(SKH-1), ROS, MMP, gelatin zymography, RT-PCR

서 론

피부 노화는 나이가 증가하면서 개인의 유전적인 요인에 의하여 발생하는 내재적인 노화(intrinsic aging)와 자외선이나 외부 물질의 자극 등에 의한 산화적 스트레스에 의하여 발생하는

광노화(photoaging)로 나눌 수 있다¹⁾.

광노화는 UVB에 의하여 피부주름이 조기에 형성되며, 피부가 건조해지며, 색소가 침착되고, 말초혈관이 확장되는 임상적인 특징을 나타낸다^{2,3)}. 또한 세포가 비전형적으로 발생하며, 표피-진피 결합부위가 편평해지고, 아교질이 감소하고 탄력섬유가 소실되는 조직학적인 특징을 나타낸다^{4,5)}.

자외선에 의해 생성된 활성산소종은 피부 세포 내의 여러가지 신호전달체계를 활성화시킴으로써 기질금속 단백질분해효소(MMPs)와 같은 구조단백질 분해효소를 증가시켜 콜라겐 생성과

* 교신저자 : 오찬호, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교

· E-mail : choh@ws.ac.kr, · Tel : 063-290-1431

· 접수 : 2013/12/02 · 수정 : 2013/12/29 · 채택 : 2013/12/29

탄력섬유의 합성을 감소시키고 피부주름을 생성하는 광노화의 주된 원인이 되고 있다⁶⁾. 피부는 ROS 생성을 촉진하는 불포화지방산이 풍부하고 고산소분압과 자외선에 노출되어 있으므로 ROS에 의하여 쉽게 손상을 받는다⁷⁾. 피부에는 free radical과 같은 ROS를 방어하는 항산화 방어체계가 발달되어 있어 ROS에 대한 보호작용을 한다. 그러나 많은 양의 자외선에 노출되면 계속된 ROS의 공격에 의하여 방어체계가 무너져 free radical에 의하여 세포내 단백질, 지질 및 DNA의 손상과 같은 산화적 스트레스를 일으킨다^{8,9)}.

피부노화에 대한 최근의 연구는 유기합성에 의한 비타민 유도체나 천연물 소재에서 추출한 기능성 물질을 hairless mice나 인체피부세포(HaCaT)에 적용하여 관찰하고 있다¹⁰⁾. 유기합성 물질들은 자체가 매우 불안정하거나 용량에 따라 피부에 강한 자극과 사람의 체질에 따라 과민 반응을 일으킬 수 있으므로 피부노화 개선을 위한 최근의 연구는 천연물질에서 유래한 기능성 소재를 찾고 있으며¹¹⁻¹³⁾, 부작용이 적고 천연 식물성 생리활성 물질로 피부노화 억제 기능을 가진 물질을 찾기 위한 국내 연구도 활발히 진행되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

차류는 천연물 유래 항산화물질인 polyphenol류와 flavonoid류의 다양한 생리활성을 물질을 가지고 있는데¹⁷⁾, 특히 감잎은 flavonoids의 강한 항산화 작용과 항암작용, 체내 지방저하¹⁸⁾, 카페인, 수용성 탄닌, 비타민 C, 아미노산 등의 함량이 높으며¹⁹⁾, 수용성 탄닌은 활성산소의 free radical을 억제하는 효과와 ACE (angiotensin-converting enzyme)활성 저해작용이 있는 것으로 알려져 있다^{20,21)}. 차류 추출물의 항산화 작용은 활성산소에 의한 지질의 과산화반응 억제 및 금속이온을 차단하는 역할을 하는데, 그 주된 작용인자는 polyphenol류가 관여하는 것으로 추정하고 있다²²⁾.

그러므로 본 연구는 천연소재에서 항산화 기능을 갖고 있는 감잎의 피부 노화에방 및 조절을 확인하기 위해 HaCaT cell line을 이용하여 항산화 기능과 주름개선 효과를 관찰하였고, hairless 마우스에 반복적인 UVB를 조사하여 광노화 피부를 유발시킨 후 감잎 열수추출물을 경구투여 및 도포를 하여 면역조직화학 염색법 및 분자생물학적 방법에 의하여 주름생성 물질과 염증관련 물질의 변화 등을 관찰하여 피부노화 개선 효과에 대한 유효성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 조제

감잎차 추출물은 건조한 감잎 500 g을 70℃의 따뜻한 물 2 L에 20분간 담구어 우려낸 것을 감잎차 추출물 I군(persimmon leaf tea, PLT-I)이라하였고, 1차로 추출한 후 다시 70℃의 따뜻한 물 2 L에 담구어 우려낸 것을 감잎차 추출물 II군(PLT-II)이라고 하였다. 최종적으로 2차 추출 후 다시 70℃의 따뜻한 물 2 L에 담구어 우려낸 것을 감잎차 추출물 III군(PLT-III)이라고 하였다. 각각의 회수한 감잎차 추출액은 여과하여 감압건조기에서 농축하고 동결건조하여 최종 수득물을 회수하였다. 회수한 시료는

PLT-I은 77.3 g을, PLT-II는 44.9 g을, PLT-III은 9.6 g을 회수하였다.

2. 실험동물 및 처치

본 실험에 사용한 7주령, 숫컷, hairless 생쥐(SKH-1 hairless mice)는 오리엔트바이오에서 분양받아 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 항온항습(22±2℃, 65±2% RH)하에서 사육하였고, 사료는 시판하는 고형사료를 공급하였다. 실험동물은 4개군으로 분류하여 군별로 5마리씩 배정하여 실험에 사용하였다. 동물실험은 우석대학교 동물실험윤리위원회의 승인(WS2012-008)을 받아 실시하였다. 모든 실험군은 정상군, 대조군, 감잎차 추출물 투여군으로 나누었다. 정상군은 아무런 처치도 하지 않았으며, 대조군은 생리식염수 투여 후 무시료 도포액인 기본로션(vehicle)만을 도포한다. 감잎차 추출물 투여군은 각각 회수한 감잎차 동결건조물 300 mg을 10 ml의 증류수에 용해하여 300 mg/Kg B.W. 용량으로 1일 1회 경구 투여하였다. 각 실험군의 감잎차 도포액은 에탄올, 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 증류수를 각각 30:20:50(v/v/v)의 비율로 잘 혼합한 기본로션에 감잎차 동결건조물을 2% 농도(1 g/50 ml)로 첨가하여 제조한 후 1일 1회 도포액 100 μ l를 hairless 생쥐의 귀에서 등부위 전체에 도포한 후 잘 문질러준 후 1시간 후에 UVB를 등부분에 조사하였다. 실험이 종료된 후 실험동물을 마취한 후 혈액을 채취한 후 혈액학적 분석에 사용하였고, 등쪽 피부조직을 절취하여 일부는 냉동고에 보관한 후 분자생물학적 검사에 사용하였고, 일부는 Bouin solution과 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 광학 및 면역조직화학적 염색에 사용하였다.

3. 피부노화 유발 및 시료 도포

자외선 조사장치는 실험실에서 자체 제작한 캐비닛 내에 20W Ultraviolet B(UVB) lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan)를 부착한 후 조사한 광원을 UV Light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan)로 측정한 후 UVB 강도(intensity)가 0.3 mW/cm²가 되는 높이에서 조사하였다. 실험동물의 UVB 조사는 아크릴로 제작한 조사틀에 실험군 별로 각각의 생쥐를 가둔 후 생쥐의 등부위가 노출되도록 위쪽은 철망을 부착한다. UVB 조사량은 최초 1주간은 1 MED(minimal erythema dose)에 해당하는 60 mJ/cm²를 1주에 5회(200초)씩 조사하였고, 2주는 120 mJ/cm²(400초), 3주는 180 mJ/cm²(600초), 4주는 240 mJ/cm²(800초)로 1주에 5회씩 조사하여 총 4주간 실시하였다.

4. 피부 최소홍반도 측정

피부 최소홍반도를 측정하기 위하여 20W UVB lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan)에서 조사한 자외선 강도가 0.3 mW/cm²가 되도록 UV Light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan)로 측정하여 조사 높이를 정한 후 최소홍반량(minimal erythema dose)을 결정하였다. 최소홍반량은 hairless 생쥐의 등에 1x1cm²의 넓이로 소구획을 나눈 후 UVB를 30 mJ/cm²에서 80 mJ/cm²까지의 조사량을 10 mJ/cm² 간격으로 조사한다. UVB 조사 후 24시간이 경과한 후에 경계가 분명하고 네 모서리

가 뚜렷한 흥반을 보이는 가장 낮은 광량인 60 mJ/cm²을 최소흥반량으로 정하였다.

5. 피부조직의 면역조직화학적 염색

피부 조직내 사이토카인, 효소 및 수용체에 대한 면역조직화학적 변화를 관찰하고자 피부조직을 절취한 후 Bouin solution에 24시간 고정된 후 일반적인 방법으로 파라핀 절편을 제작하였다. 파라핀 절편은 7 μm의 두께로 절단한 후 100% methanol에 0.3% H₂O₂를 넣은 용액에서 endogeneous peroxidase를 제거하였다. 그 후 비특이적인 면역반응을 제거하기 위하여 30분간 정상혈청(normal serum, 1:50)으로 처리한다. UVB조사 후 변화가 있을 것으로 예상되는 사이토카인 MMP(matrix metalloproteinase)-2(1:100, Santa Cruz, CA, USA), MMP-3(1:100, Santa Cruz, CA, USA), MMP-9(1:100, Santa Cruz, CA, USA)를 일차항체로 이용한다. 일차항체의 희석배율은 구입한 회사에 따라 차이가 있으므로 각각의 항체에 대한 positive control test를 실시하여 적절한 항체 희석 배율을 정한 후 4℃의 moisture chamber에서 24시간 염색하였다. 2차항체는 1차항체 반응 후 5분간 3회 0.1 M PB로 수세과정을 거친 후에 Hsu 등²³⁾의 방법에 따라 biotinylated anti-IgG(Vector Laboratories, Inc., CA, USA)를 1:200으로 희석한 후 실온의 moisture chamber에서 30분 반응시켰다. 다시 5분간 3회 0.1 M PB 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에서 30분간 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PBS로 15분간 2회 수세하고 나서 30 mg의 3-3' diaminobenzidine를 150 ml의 0.1 M PBS에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 15분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

6. HaCaT cells을 이용한 시험관내 실험

1) 세포배양

Human keratinocyte cell line인 HaCaT cell은 CLS (Cell Lines Service)로부터 분양을 받아 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)(Hyclone; Logan, UT, USA)에 10% FBS, 100U/ml penicillin과 100μg/ml streptomycin (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 배양하였다. 세포는 37℃ incubator에서 5% CO₂ 상태에서 배양하였다.

2) 세포생존율 측정

Mosmann이 보고한 방법²⁴⁾에 따라 살아있는 세포의 효소활성으로 인한 tetrazolium dye인 MTT를 자줏빛의 불용해성 포르마잔으로 환원하는 원리를 이용한 MTT assay를 통하여 감염이 HaCaT 세포의 생존에 미치는 효과를 측정하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 well 당 1×10⁵ cells 밀도로 분주한 후 감염을 농도별로 처리한 후 37℃, 5% CO₂, 습도 100% 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 새로운 배지로 교환하여 4시간 동안 배양한 후 PBS에 용해한 MTT(0.5 mg/ml)용액 50 μl/ml를 각 well에 넣고 3시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 버

리고 0.01N HCl로 만든 10% SDS를 100 μl/well씩 넣어 MTT-formazan crystal을 용해한 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 확인하였다. 살아있는 세포의 백분율은 미처리 세포를 기준으로 계산하였다. 모든 실험은 3번 반복하였다.

3) Ultraviolet B(UVB) 조사

세포배양 실험의 자외선 조사는 20W Ultraviolet B(UVB) lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan)에서 조사한 광원을 UV Light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan)로 측정된 후 UVB 강도(intensity)가 0.3mW/cm²가 되는 높이에서 3×10⁵cells/ml의 농도로 DMEM medium에 부유시켜 6 well plate에 분주한 후 감염차 추출물을 실험의 종류에 따라 농도별로 전처리(0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml)한 후 24시간 동안 배양한 후 60 mJ/cm²를 1회 조사하였다.

4) 세포내 Reactive Oxygen Species(ROS) 생성 측정

Human keratinocyte cell line인 HaCaT cell 내 ROS의 생성은 carboxy-H2DCFDA (5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하여 측정하였다. DCFH-DA는 쉽게 세포막을 뚫고 세포 안으로 확산되어 세포 안의 에스테라아제에 의해 형광을 잃은 DCFH로 가수분해 되고, 이후 ROS가 존재하는 환경에서 높은 형광을 띄는 DCF로 빠르게 산화된다. 따라서 DCF의 형광 강도는 세포 안의 ROS의 양과 비례한다. HaCaT cell을 3×10⁵ cells/ml의 농도로 부유시켜 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 incubation 하였다. HaCaT 세포를 60 mJ/cm²의 UV로 자극하고 16시간 동안 배양한 후 감염차추출물(PLT-I, PLT-II, PLT-III)을 농도별로 처리(50, 100, 200, 300 μg/ml)하고 DCFH-DA를 10 μM의 농도로 5분 동안 처리한 후 형광도를 측정하였다. DCF 형광도는 excitation 485 nm, emission 530 nm의 파장에서 Wallac 1420 VICTOR3 multilabel counter(PerkinElmer Life Science, Turku, Finland)로 측정하였다.

5) Gelatin zymography assay

MMP-9의 분비를 측정하기 위하여 substrate gel zymography를 시행하였다²⁵⁾. HaCaT 세포를 3×10⁵ cell/ml의 농도로 분주하였다. 실험시작 전 무혈청배지로 교환한 후 감염추출물을 농도별(50, 100, 200 μg/ml)로 1시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 60 mJ/cm²세기의 UVB로 자극시키고 다시 24시간 배양하였다. 배지에 존재하는 분비된 단백질의 양은 세포의 숫자로 가늠하였다. 배지를 62.5 mM Tris - HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, and 0.00625% (w/v) bromophenol blue가 함유된 sample buffer에 섞고, 0.1% gelatin이 함유된 7.5% acrylamide/bisacrylamide (29.2:0.8) separating gel에 loading 한 후 4℃, 100V에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel을 0.25% Triton X-100에 30분 동안 두 번 담가 SDS를 제거하였다. 3차 증류수로 씻은 후 0.1% (w/v) Coomassie blue R-250 용액에서 30분간 염색하여 관찰하였다.

6) 총 RNA의 추출과 RT-PCR

Total RNA는 Trizol reagent(Invitrogen)를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다. Spectrophotometer를 이용하여 RNA의 농도를 측량한 후 M-MLV reverse transcriptase(Promega, Madison, WI, USA)에 의하여 cDNA를 합성하였고, specific primer 들을 이용한 PCR방법을 통하여 cDNA를 증폭하였다.

PCR 증폭을 하기 위하여 TaqPCRxDNA polymerase, Recombinant (Invitrogen) 을 사용하였고, 반응조건은 다음과 같이 하였다. 95℃에서 5분간 초기 denaturation 시킨 후 30 cycle 을 증폭시켰다. 각각의 cycle은 95℃에서 30초 동안 denaturation, 62℃(TNF-α: 59℃)에서 30 초 동안 annealing, 72℃에서 40 초 동안 extension시켰다. PCR product는 1 % agarose gel에서 전기영동 하였고, ethidium bromide로 염색을 한 후 Gel Doc(Bio-Rad, USA)을 사용하여 관찰하였다. β-actin을 internal control로 사용하여 TNF-α, IL-1β의 발현을 상대적으로 평가하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR in this study

Target	gene	PCR primer sequence(5' to 3')	Expected size
IL-1β	sense	GCA CAA GGC ACA ACA GGC TGC	463bp
	antisense	TGC TGT GAG TCC CGG AGC GT	
TNF-α	sense	AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT	434bp
	antisense	CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC	
β-actin	sense	CAA GAG ATG GCC ACG GCT GCT	247bp
	antisense	TCC TTC TGC ATC CTG TCG GCA	

7. 통계 분석

통계적 분석은 SPSS 12.0 for windows (SPSS Inc., USA)를 이용하여 평균과 표준편차를 산출하였으며, 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 적용하였다. 각 군간 차이를 검증하기 위하여 t 검증(paired t-test)을 실시하고, 통계적 유의수준은 p<0.05로 실시하였다.

결 과

1. 세포생존율에 미치는 효과

다양한 추출조건에서 추출한 감잎차 추출물(PLTs)이 HaCaT 세포에 대한 세포독성을 MTT assay를 통하여 측정된 결과 PLT-I, PLT-II 및 PLT-III는 200 ug/ml의 농도까지 어떠한 세포 독성도 나타내지 않았다(Fig. 1-3).

2. 감잎차 추출물의 세포내 활성산소종(ROS) 생성 억제효과

다양한 추출조건에서 추출한 감잎차 추출물(PLTs)이 UVB에 의하여 증가된 세포내 ROS에 미치는 영향을 관찰하고자 DCFH-DA assay를 시행하였다. HaCaT 세포에 60 mJ/cm2의 UVB로 자극하여 12시간을 방치한 후 감잎차 추출물을 농도별로 처리함과 아울러 DCFH-DA 시약을 처리하고, 5분 후 형광 흡광도를 측정하였다. 그림 16-18에서 보는 바와 같이 UVB의 자극은 세포 내 ROS의 생성을 유의성있게 현저히 증가시켰으며(2nd column, #p<0.001), 이러한 ROS의 생성은 감잎차 추출물(PLT)-I의 처리에 의하여 농도의존적으로 유의성있게 억제되었다(3rd,

4th, 5th, 6th columns; p<0.05, p<0.01, p<0.001)(Fig. 4). 또한 감잎차 추출물(PLT)-II의 처리에 의하여도 농도의존적으로 유의성 있게 억제되었다(3rd, 4th, 5th, 6th columns; p<0.01, p<0.001)(Fig. 5). 그러나 감잎차 추출물(PLT)-III을 처리한 군에서는 농도의존적으로 유의성은 관찰되지 않았지만 대조군에 비하여는 미약하게 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 6).

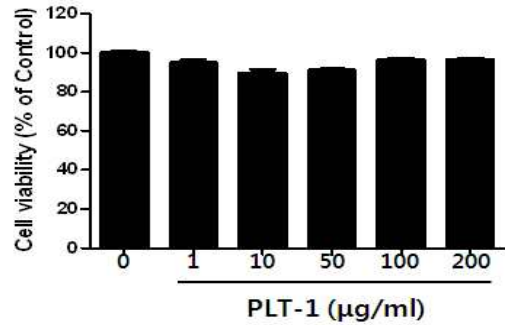


Fig. 1. Cytotoxic effect of persimmon leaf tea(PLT)-I extracts on HaCaT cells. To determine the cytotoxicity of PLT-I on HaCaT cells, MTT assay was performed. HaCaT cells were treated with indicated amount of PLT-I for 24 h before the MTT assay. Data represent the mean ± SD of 3 independent measurements.

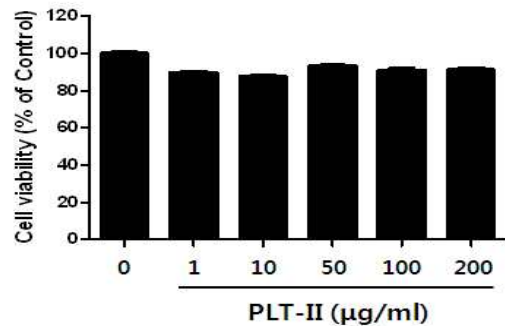


Fig. 2. Cytotoxic effect of persimmon leaf tea(PLT)-II extracts on HaCaT cells. To determine the cytotoxicity of PLT-II on HaCaT cells, MTT assay was performed. HaCaT cells were treated with indicated amount of PLT-II for 24 h before the MTT assay. Data represent the mean ± SD of 3 independent measurements.

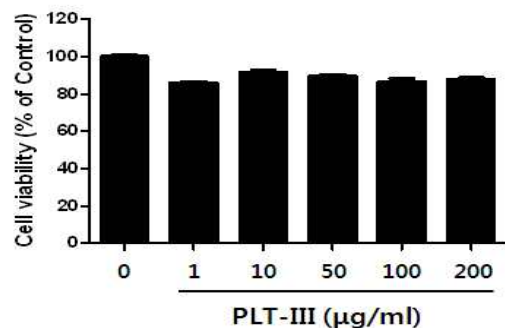


Fig. 3. Cytotoxic effect of persimmon leaf tea(PLT)-III extracts on HaCaT cells. To determine the cytotoxicity of PLT-III on HaCaT cells, MTT assay was performed. HaCaT cells were treated with indicated amount of PLTs for 24 h before the MTT assay. Data represent the mean ± SD of 3 independent measurements.

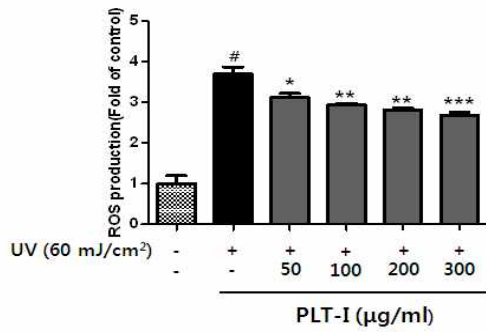


Fig. 4. PLT-I suppresses ROS production. UV radiation increased intracellular ROS production in HaCaT cells. Increased ROS reduced by the treatment of PLT-I. Shown are mean \pm SD (n=3). #P<0.001, compared to control(1st column from left); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, compared to UV stimulated group (2nd column from left).

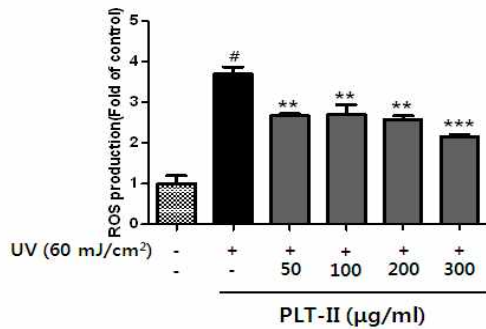


Fig. 5. PLT-II suppresses ROS production. UV radiation increased intracellular ROS production in HaCaT cells. Increased ROS reduced by the treatment of PLT-II. Shown are mean \pm SD (n=3). #p<0.001, compared to control(1st column from left); **p<0.01, ***p<0.001, compared to UV stimulated group (2nd column from left)

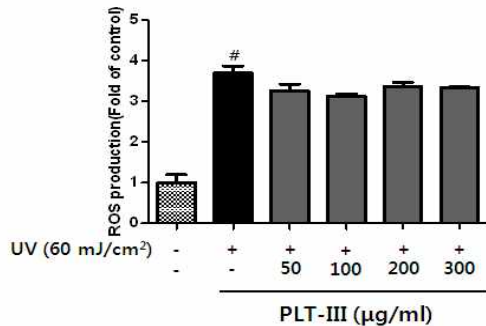


Fig. 6. PLT-III suppresses ROS production. UV radiation increased intracellular ROS production in HaCaT cells. Increased ROS reduced by the treatment of PLT-III. Shown are mean \pm SD (n=3). #p<0.001, compared to control(1st column from left); PLT-III group was not significant compared to UV stimulated group (2nd column from left).

3. 감염차 추출물의 피부조직내 면역조직화학적 염색반응

1) Matrix metalloproteinase(MMP)-2에 대한 면역염색반응

SKH-1 hairless mice의 피부조직의 세포외기질(extracellular matrix) 분해능의 지표로 관찰하기 위하여 MMP-2 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. MMP-2의 발현은 UVB를 조사하지 않은 정상군(N)(Fig. 7)의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 미약하게 발현되었으나 UVB를 4주간 조사한 대조군

(C)(Fig. 7)의 표피 상피세포층과 진피층에서는 N군에 비해 비교적 강하게 발현되었다. UVB를 조사하면서 4주간 감염차 추출물을 투여하고 도포한 PLT-I, -II, -III군의 표피 상피세포층에서는 C군에 비해 미약하게 발현되었다(Fig. 7).

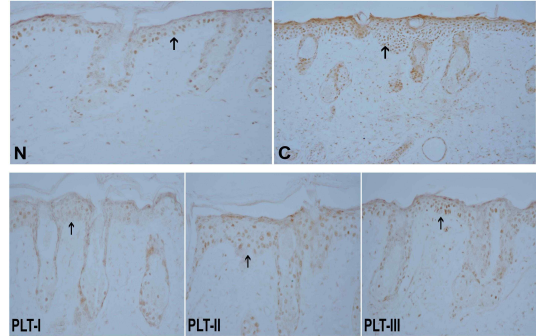


Fig. 7. Immunohistological changes of MMP-2 in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, PLT-I, PLT-II, PLT-III) and non-irradiated normal group(N)(MMP-2 immunohistochemical stain, x200). The effects of PLT-I, -II, -III treated groups showing reduced MMP-2 expression within skin compared to control group(C); Arrows, MMP-2 immunoreacted cells.

2) MMP-3에 대한 면역염색반응

SKH-1 hairless mice의 피부조직의 세포외기질(extracellular matrix) 분해능의 지표로 관찰하기 위하여 MMP-3 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. MMP-3의 발현은 UVB를 조사하지 않은 정상군(N)(Fig. 8)의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 미약하게 발현되었으나 UVB를 4주간 조사한 대조군(C)(Fig. 8)의 표피 상피세포층과 진피층에서는 N군에 비해 비교적 강하게 발현되었다. UVB를 조사하면서 4주간 감염차를 투여하고 도포한 PLT-I과 PLT-III군의 표피 상피세포층에서는 C군에 비해 미약하게 발현되었다(Fig. 8).

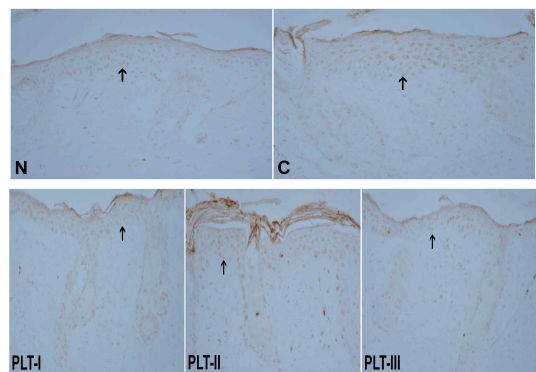


Fig. 8. Immunohistological changes of MMP-3 in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, PLT-I, PLT-II, PLT-III) and non-irradiated normal group(N)(MMP-3 immunohistochemical stain, x200). The effects of PLT-I and PLT-III treated groups showing reduced MMP-3 expression within skin compared to control group(C); Arrows, MMP-3 immunoreacted cells.

3) MMP-9에 대한 면역염색반응

SKH-1 hairless mice의 피부조직의 세포외기질(extracellular

matrix) 분해능의 지표로 관찰하기 위하여 MMP-9 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. MMP-9의 발현은 UVB를 조사하지 않은 정상군(N)(Fig. 9)의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 미약하게 발현되었으나 UVB를 4주간 조사한 대조군(C)(Fig. 9)의 표피 상피세포층과 진피층에서는 N군에 비해 비교적 강하게 발현되었다. UVB를 조사하면서 4주간 감잎차를 투여하고 도포한 PLT-I과 PLT-II군의 표피 상피세포층에서는 C군에 비해 미약하게 발현되었다(Fig. 9).

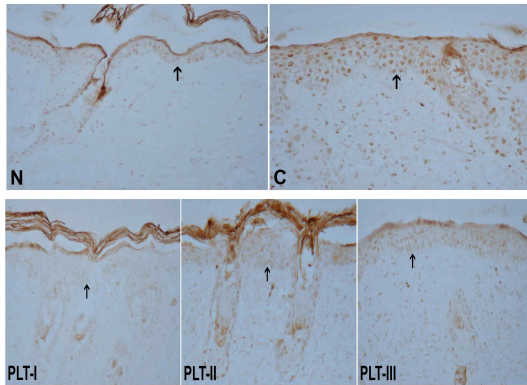


Fig. 9. Immunohistological changes of MMP-9 in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, PLT-I, PLT-II, PLT-III) and non-irradiated normal group(N)(MMP-9 immunohistochemical stain, x200). The effects of PLT-I and PLT-II treated groups showing reduced MMP-9 expression within skin compared to control group(C); Arrows, MMP-9 immunoreacted cells.

4. UVB로 자극한 HaCaT 세포에서 MMP-9의 분비에 대한 억제 효과

감잎차 추출물의 HaCaT 세포에서의 MMP-9의 활성에 대한 효능을 관찰하고자 gelatin zymographic assay를 시행하였다. HaCaT cell은 다양한 농도의 감잎차 추출물(PLT-I, -II, -III)로 1시간 동안 선처리 하였다. 60 mJ/cm²의 UVB로 자극을 하고 24시간 동안 배양한 후 배양액을 전기영동하였다. PLT-I은 모든 농도에서 MMP-9의 활성을 감소시키지 않았으나 PLT-II는 200 ug/ml의 농도에서 MMP-9의 활성을 감소시켰고, PLT-III은 200 ug/ml의 농도에서 MMP-9의 활성을 감소시켰다(Fig. 10).

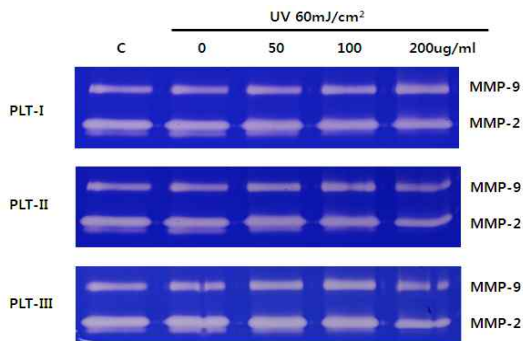


Fig. 10. Inhibitory effect of PLT-I, -II, -III on MMP-9 expression in UV-stimulated HaCaT cells. HaCaT cells were pre-incubated with the indicated amount of PLT-I for 1 h and then stimulated with UVB for 24 h. Conditioned media were analyzed by zymography for MMP-9 activity.

5. HaCaT 세포에서 염증과 연관된 인자(IL-1 β 와 TNF- α)의 mRNA 발현에 미치는 영향

감잎차 추출물이 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 HaCaT 세포에 다양한 농도의 감잎차 추출물(PLT-I, -II, -III)을 2시간 선처리하고, UV로 자극을 한 후 24시간을 배양하였다. 전체 RNA를 세포에서 추출하였고, TNF- α , IL-1 β mRNA의 발현은 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 그림에서 보는 바와 같이 UV는 HaCaT 세포에서 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현을 증가시켰으며, PLT-I과 PLT-II는 이들의 발현을 농도의존적으로 감소시켰으며, PLT-III은 IL-1 β 의 발현을 감소시켰으나 TNF- α 의 발현에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 11).

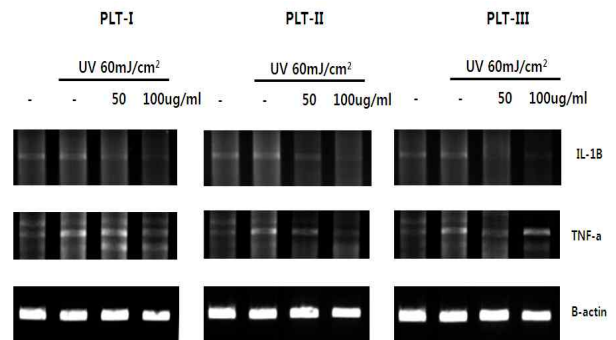


Fig. 11. PLT-I and PLT-II down-regulates the expression of various inflammatory cytokines(TNF- α and IL-1 β). But PLT-III down-regulates the expression of IL-1 β inflammatory cytokine. Total RNA was extracted from HaCaT cells differentially treated with PLT-I and UV, and analyzed by semiquantitative RT-PCR for IL-1 β , TNF- α . Relative expression of each mRNA was also shown against the message of β -actin, and internal control.

고찰

노화는 모든 기관(organ)에서 동등하게 점진적으로 일어나고 있으나 피부의 노화는 온도, 습도, 매연 및 기계적인 자극과 같은 외부환경 인자에 항상 노출되기 때문에 다른 기관의 노화와는 차이가 있으며, 이들 인자 중 자외선이 피부에 가장 많은 영향을 미치고 있다²⁶⁻²⁸).

피부노화는 내재적인 노화(intrinsic aging)와 광노화(photoaging)로 나누며, 내재적인 노화는 모든 생물체에서 공통적으로 일어나는 생물학적인 기전에 의하여 발생하며²⁹, 광노화는 태양광선에 장기간 노출될 때 발생한다^{2,3}. 광노화 피부는 태양광선 중의 자외선에 노출되었을 때 발생하는 임상적, 조직학적, 기능적인 특징을 나타내며, 자외선에 의한 만성적인 노출로 피부구조와 기능에 부작용을 초래하며, 자외선의 양과 종류에 따라 피부에 나타나는 고유한 병태 생리학적 특징을 갖고 있다.

피부노화의 가장 주된 원인 중 하나인 자외선은 인간의 피부에 화상, 면역억제, 암 및 조기노화와 같은 손상을 입히고 있다²⁹. 태양광선에 지나치게 노출되면 급성으로 화상과 면역억제 현상을 일으키고, 반복적으로 노출되면 지속적인 손상에 의하여 피부암이나 광노화를 초래한다³⁰. 그 중 UVB는 홍반, 주름 및 피부암과 같은 광손상을 야기하고, UV에 의한 활성산소종을 생성하

여 아교질, 탄성질, 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans)과 같은 세포외기질의 구조적 또는 기능적인 변화를 초래하며, 세포구성 성분인 DNA, 단백질 및 지질의 변성을 초래한다³¹⁾. 자외선에 노출된 피부는 진피층의 섬유아세포에서 아교질의 생산이 감소하고, 기질 금속 단백질 분해 효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현이 증가하여 기질 단백질의 분해가 증가된다는 것이 밝혀졌다³²⁻³⁵⁾.

피부노화에 관한 연구는 자외선과 아교질과의 관계 및 MMPs의 조절에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며³⁵⁾, 광노화된 피부에서 탄력섬유의 비정상적인 침착 현상에 대한 연구가 중점적으로 이루어져 왔다³⁶⁾. 최근에는 피부노화 억제와 치료를 위한 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 피부에 부작용이 적은 천연소재에서 생리활성 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

감은 우리나라와 일본, 중국 등 동양권 이외에 서양에서도 그 효능이 많이 알려져 있으며, 감잎도 녹차 이상으로 다양한 생리활성물질을 함유하고 있다고 보고되고 있다. 감잎은 감나무과의 감잎 큰키나무 감나무(*Diospyros kaki* THUNB.)의 잎으로 柿葉이라 하며, 性은 寒하고 味는 苦하며 무독하며, 止血과 血小板 감소성 紫斑을 치료하는 데 효능이 있으며, 잎에는 비타민 C, 카로틴 및 pantothenic acid가 풍부하고, 특히 잎에서 추출한 flavonoid glycoside는 혈압을 내리고 관상동맥의 혈류량을 증가시킨다고 하였다^{37,38)}. 감잎은 다른 과일에 비해 비타민 A와 C가 풍부하여 여러가지 생리활성을 나타내며, 기능성 페놀화합물이 다량 함유되어 있어 항산화기능, 노화방지, 심혈관계 질환 예방 및 항암효과 등이 보고되어 있다³⁹⁻⁴¹⁾. 감잎의 성분과 그 효과에 관한 연구는 최근에 많이 이루어지고 있는 실정이다. 감잎의 성분으로는 tannin, polyphenol류, 수지, coumarin류 화합물, betulic acid, oleanolic acid, ursolic acid와 같은 유기산 및 엽록소, astragaloside, myricitrin과 같은 flavonoid 배당체, 비타민 A와 C를 과량 함유하고 있으며 비타민 B1, 판토텐산, 엽산의 함유량이 많은 것으로 보고되고 있다⁴²⁾.

감잎에 대한 연구는 감잎의 처리방법과 추출조건에 따른 Vitamin C와 superoxide dismutase 유사활성의 변화⁴³⁾, 항산화 효과⁴⁴⁾, 돌연변이 억제 효과⁴⁵⁾, 간손상 억제 효과⁴⁶⁾ 및 알레르기성 접촉피부염⁴⁷⁾ 등에 대하여 보고되었다. 또한 An 등⁴⁸⁾은 감잎에서 추출한 폴리페놀이 유해산소(xanthine oxidase)의 생성을 억제하고, tyrosinase, elastase 및 collagenase를 억제한다고 하였다.

현재까지 감잎의 연구는 감잎 추출물의 항산화 효과와 알레르기와의 관련된 연구는 많이 진행되어 있으나 감잎 추출물의 광노화피부와 관련된 연구는 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 감잎 추출물의 광노화피부 개선 효과를 관찰하기 위하여 hairless mice를 이용하여 자외선에 의한 광노화 피부 억제인자들의 변화를 면역조직화학 염색 및 분자생물학적으로 관찰하였다.

활성산소종(ROS)은 고에너지 복사선, 광증감 반응 및 일부 효소반응과 같은 과정을 거쳐 세포와 조직에서 생성되는데, 생체 내에서 과잉의 활성산소는 염증, 돌연변이, 세포살해, 발암, 피부노화 등이 나타난다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 높

은 농도의 활성산소종이 생성된다. 계속된 활성산소의 공격은 피부의 항산화 방어 시스템을 파괴시켜 DNA, RNA, 효소 및 세포막에 손상을 일으켜 세포를 사멸시키거나 유전자 발현양식의 변화에 의한 피부암, 광독성 및 광노화를 유발시킨다⁴⁹⁾. 자외선에 의하여 생성된 H₂O₂와 hydroxy radical과 같은 free radical은 피부노화, 피부암, 염증, 허혈 등의 원인이 되며⁵⁰⁾, 이러한 산소 자유기는 전사인자인 NF(nuclear factor)-κB, AP(activator protein)-1의 binding activity를 증가시켜 기질 단백질인 아교질과 elastin 등을 분해하는 MMPs의 발현을 증가시켜 피부 기질 단백질 손상에 의하여 피부주름을 유발한다고 알려졌다⁵¹⁻⁵³⁾. 또한 활성산소종은 직접 아교질 사슬을 절단하고 비정상적인 교차결합을 일으켜 결합조직을 파괴하거나 변형을 일으킬 수 있다.

본 실험에서 보는 바와 같이 UVB의 자극은 세포 내 ROS의 생성을 유의성있게 현저히 증가시켰으며(p<0.001), 이러한 ROS의 생성은 감잎차 추출물(PLT-I)의 처리에 의하여 농도의존적으로 유의성있게 억제되었다(p<0.05, p<0.01, p<0.001). 또한 감잎차 추출물(PLT-II)의 처리에 의하여도 농도의존적으로 유의성있게 억제되어(p<0.01, p<0.001). 감잎추출물은 세포 내 ROS의 생성을 억제하는 기능을 수행하여 광노화 피부를 개선하는 효과가 있을 것으로 사료되었다.

MMPs는 세포외기질의 재구성에 관여하는 Zn 의존성 펩티드내부가수분해효소(endopeptidase)로서 형태발생, 혈관신생, 관절염, 피부궤양, 종양 침입 및 전이에 관여한다⁵⁴⁾. 현재까지 알려진 MMPs는 collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins 및 membrane-type MMPs 5군으로 알려졌으며, 콜라겐, 단백질, 당단백의 분해에 관여한다⁵⁾. 이들 MMPs 가운데 gelatinase A(MMP-2 또는 72-KDa type IV collagenase)와, gelatinase B(MMP-9 또는 92-KDa type IV collagenase)는 type IV와 type VII collagen을 분해시키고, stromelysin(MMP-3와 MMP-10)은 기저막의 접착성 단백질인 라미닌(laminin)을 분해시킨다⁵⁵⁾. MMPs는 불활성화 된 zymogen(proMMP)으로 분비되며, 활성화(active MMP)되어야 그 기능을 발휘한다. proMMP 합성을 자극하는 것은 대체로 성장인자 또는 사이토카인에 의한 전사수준하에서 조절된다⁵⁵⁾. Inomata 등⁵⁶⁾은 만성적인 UVB 자극은 MMPs 활성을 증가시켜 아교섬유와 같은 세포외기질의 파괴에 의한 기저막의 구조가 파괴되어 주름이 형성된다고 하였다.

본 실험의 동물실험에서 MMP-2의 발현은 4주간 감잎차 추출물을 투여하고 도포한 PLT-I, -II, -III군의 표피 상피세포층에서는 대조군에 비해 미약하게 발현되었고, MMP-3의 발현은 PLT-I과 PLT-III군의 표피 상피세포층에서 대조군에 비해 미약하게 발현되었다. MMP-9의 발현은 PLT-I과 PLT-II군의 표피 상피세포층에서 대조군에 비해 미약하게 발현되었다. 이상의 MMPs에 대한 실험결과는 감잎차 추출물 투여 및 도포군의 표피에서 대조군에 비하여 미약한 면역반응을 나타낸 것은 감잎차 추출물 투여 및 도포에 의하여 표피에서의 MMPs의 발현이 억제된 것으로 보아 MMPs가 진피로 확산이 적게 됨으로써 콜라겐의 분해를 억제할 것으로 사료되었다. 또한 본 실험의 HaCaT 세포에서의 MMP-9의 활성에 대한 다양한 추출조건에서 추출한 감잎차 추

출물의 효능을 관찰한 바 PLT-II와 PLT-III의 200 ug/ml의 농도에서 MMP-9의 활성을 감소시켰으므로 자외선에 대한 광노화피부를 억제시킬 것으로 사료되었다.

본 실험에서 감잎차 추출물이 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 HaCaT 세포에 다양한 농도의 감잎차 추출물(PLT-I, -II, -III)을 2시간 전처리하고, UV로 자극을 한 후 24시간을 배양한 후 TNF- α , IL-1 β mRNA의 발현은 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. UVB는 HaCaT 세포에서 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현을 증가시켰으며, PLT-I과 PLT-II는 이들의 발현을 농도의존적으로 감소시켰으며, PLT-III은 IL-1 β 의 발현을 감소시켰으나 TNF- α 의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 이상의 실험결과로 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 에 있어서 UVB는 HaCaT 세포에서 이들 유전자의 발현을 증가시켰으며, 감잎차추출물 PLT-I과 PLT-II는 이들의 발현을 농도의존적으로 감소시켜 감잎 추출물은 자외선에 의한 염증 및 광노화피부를 억제시킬 것으로 사료되었다.

이상의 실험 결과로 감잎 추출물은 UVB에 의한 광노화피부의 개선에 효과가 있을 것으로 사료되었고, 1차(PLT-I)와 2차(PLT-II) 감잎 추출물이 더욱 효과적인 것으로 사료되었다.

결론

SKH-1 hairless 생쥐 모델을 이용하여 UVB 조사 후 감잎 열수추출물을 경구투여하고 도포한 후 HaCaT세포에서의 세포독성, 활성산소종 생성 억제, 주름생성 및 염증관련 인자에 대한 분자생물학적인 관찰 및 MMP2, -3, -9발현에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 광노화피부 억제 효과를 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

감잎차 추출물이 HaCaT세포에 대한 세포독성을 MTT assay를 통하여 측정한 결과 감잎차(PLT-I), 감잎차(PLT-II) 및 감잎차(PLT-III)은 1-200 ug/ml의 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다.

감잎차 추출물의 세포내 활성산소종(ROS) 생성 억제 효과는 감잎차(PLT-I)과 감잎차(PLT-II)의 처리에 의하여 농도의존적으로 유의성있게 억제되었다.

UVB를 조사한 HaCaT세포에서의 MMP-9의 활성에 대한 효능을 관찰하고자 gelatin zymography assay를 시행한 바 감잎차(PLT-II)와 감잎차(PLT-III) 처리군의 200 ug/ml의 농도에서 MMP-9의 활성을 감소시켰다.

피부조직의 세포외기질 분해능의 지표인 MMP-2, MMP-3 및 MMP-9를 면역조직화학적 염색 반응은 UVB를 조사하면서 4주간 감잎차 추출물을 투여하고 도포한 PLT-I, -II, -III군의 표피상피세포층의 MMP-2 발현은 대조군에 비해 미약하게 발현되었고, MMP-3과 MMP-9의 발현은 PLT-I과 PLT-III군의 표피상피세포층에서는 대조군에 비해 미약하게 발현되었다.

UVB를 조사한 HaCaT세포에서의 염증과 연관된 인자인 IL-1 β 와 TNF- α mRNA 발현에 미치는 영향은 PLT-I, PLT-II 및

PLT-III군은 IL-1 β mRNA 발현을 농도의존적으로 감소시켰으며, TNF- α mRNA 발현은 PLT-I군과 PLT-II군에서만 농도의존적으로 감소시켰다.

이상의 실험결과로 3종류의 감잎 추출물 중 PLT-I군과 PLT-II군이 UVB조사에 의한 광노화피부에 대한 동물실험과 HaCaT세포에서의 활성산소종 생성 억제, 주름관련 인자(MMP-2, MMP-3 및 MMP-9) 및 염증과 연관된 인자(IL-1 β 와 TNF- α)의 개선효과가 우수한 것으로 입증되었으므로 향후 감잎의 생체 내 이용에 대한 다양한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 우석대학교 LINC사업단 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Meinhard, W., Iiana, T.B., Lale, N., Wenjian, M., Lars, A.S., Ziba, R.W., Jutta, S., Karin, S.K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem and Photobiology* 63: 41-51, 2001.
2. Gilcrest, B.A. Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol* 98(21):610-613, 1989.
3. Griffiths, C.E.M. The clinical identification and quantification of photodamage. *Br J Dermatol* 127(Suppl. 41):37-42, 1992.
4. Lavker, R.M. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol* 73: 59-66, 1979.
5. Kligman, A.M., Grove, G.L., Hirose, R., Leyden, J.J. Topical tretinoin for photodamaged skin. *J Am Acad Dermatol* 15: 836-859, 1986.
6. Berneburg, M., Plettenberg, H., Krutmann, J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16: 239-244, 2000.
7. Pillai, S., Oresajo, C., Hayward, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int J Cosmet Sci* 27: 17-24, 2005.
8. Kehrer, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Crit Rev Toxicol* 23: 21-28, 1993.
9. Aruoma, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidant. *Food Chem Toxicol* 62: 671-683, 1994.
10. 박창민, 이순영, 정민석, 최종완. 3-O-cetyl-L-ascorbic acid의 주름 개선 효과. *대한화장품학회지* 34(4):303-309, 2008.
11. Wyss, R. Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids. *J Chromatogr B, Biomed*

- Sci Appl 671:381-425, 1995.
12. Weiss, J.S., Ellis, C.N., Headington, J.T., Voorhees, J.J. Topical tretinoin in the treatment of aging skin. *J Am Acad Dermatol* 19: 169-175, 1988.
 13. Gary, J.F., Kang, S.W., Varani, J., Zsuzsanna, B.C., Wan, Y., Datta, S. Voorhees, J.J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 138: 1462-1470, 2002.
 14. Kim, Y.G., Sumiyoshi, M., Sakanaka, M., Kimura, Y. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. *Eur J Pharm* 602: 148-156, 2009.
 15. 전테레사, 최소영, 김영철, 장병수. 홍차 열수추출물의 피부노화 개선 효과. *대한미용학회지* 7(4):441-447, 2011.
 16. Lee, S.J., Cho, S.W., Kwon, Y.Y., Kwon, H.S., Shin, W.C. Inhibitory effects of ethanol extracts from Nuruk on oxidative stress, melanogenesis, and photo-aging. *Mycobiology* 40(2):117-123, 2012.
 17. Son, J.Y., Kom, T.O. Antioxidative and physiological activities of traditional korean teas. *Korean J Food Cookery Sci* 27(5):567-575, 2011.
 18. 오현명, 김미경. Effects of Dried leaf powders, water and ethanol extracts of persimmon and green tea leaves on lipid metabolism and antioxidative capacity in 12-month-old rats. *한국식품영양과학회지* 34(3):285-298, 2001.
 19. Joung, S.Y., Lee, S.J., Sung, N.J., Jo, J.S., Kang, S.K. The chemical composition of persimmon(Diospyros kaki, thumb) leaf tea. *J Korean Soc Food Nutr* 24(5):720-726, 1995.
 20. Uchida, S., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Nonaka, G.Y., Nishioka, I., Niwa, M., Ozaki, M. Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. *Med Sci Res* 15(5):831-834, 1987.
 21. Kameda, K., Takaku, T., Okuda, H., Kimura, Y. Inhibitory effects of various flavonoids isolate from leaf of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J Nat Products* 50(4):680-686, 1987.
 22. 여생규, 안철우, 이용우, 이태기, 박영호, 김선봉. Antioxidative effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *한국식품영양과학회지* 24(2):299-304, 1995.
 23. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981.
 24. Mosmann, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1 - 2):55-63, 1983.
 25. Ha, K.T., Kim, J.K., Lee, Y.C., Kim, C.H. Inhibitory effect of Daesungki-Tang on the invasiveness potential of hepatocellular carcinoma through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Toxicol Appl Pharmacol* 200(1):1-6, 2004.
 26. Placzec, M., Kerkmann, U., Bell, S., Koepke, P., Przybilla, B. Tobacco smoke is phototoxic. *Br J Dermatol* 150: 991-993, 2004.
 27. Fisher, G.J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., Voorhees, J.J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 138:1462-1470, 2002
 28. Landau, M. Exogenous factors in skin aging. *Curr Probl Dermatol* 35: 1-13, 2007.
 29. Cooper, K.D., Oberhelman, L., Hamilton, T.A., et al. UV exposure reduces immunization rates and promotes tolerance to epicutaneous antigens in humans: relationship to dose, CD1a-DR epidermal macrophage induction, and Langerhans cell depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8497-8501, 1992.
 30. Fisher, G.J., Wang, Z.Q., Datta, S.C., Varani, J., Kang, S., voorhees J. Pathophysiology of premature aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337: 1419-1428, 1997.
 31. Sander, C.S., Chang, H., Salzmann, S., Müller, C.S., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P., Thiele, J.J. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 118(4):618-625, 2002.
 32. Chung, J.H., Seo, J.Y., Choi, H.R., Lee, M.K., Youn, C.S., Rhie, G., Cho, K.H., Kim, K.H., Park, K.C., Eun, H.C. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117: 1218-1224, 2001.
 33. Gilchrist, B.A. A review of skin aging and its medical therapy. *Br J Dermatol* 135: 867-875, 1996.
 34. Fisher, G.J., Datta, S.C., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J.J. Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature* 379(6563):335-339, 1996.
 35. Kiss, I., Chen, S., Trampusch, K.M. The effect of high and low ultraviolet-B dose exposure on the degree of hairless mouse skin wrinkling. *Photochem Photobiol* 53: 109-112, 1991.
 36. Seo, J.Y., Lee, S.H., Youn, C.S., Choi, H.R., Rhie, G.E., Cho, K.H., Kim, K.H., Park, K.C., Eun, H.C., Chung, J.H. Ultraviolet radiation increases tropoelastin mRNA

- expression in the epidermis of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 116: 915-919, 2001.
37. 안덕균. 한국본초도감. 교학사, 서울, p460, 1999.
 38. 이경순, 안덕균, 신민교, 김창민 외. 환약 중약대사전, 도서출판 정담, 서울, p 2614, 1997.
 39. Moon, S.H., Kim, K.H., Park, K.Y. Antitumor effect of persimmon leaves in vivo using sarcoma-180 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 865-870, 1996.
 40. Ma, J., Liu, X.Y., Noh, K.H., Kim, M.J., Song, Y.S. Protective effects of persimmon leaf and fruit extracts against acute ethanol-induced hepatotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 12: 202-208, 2007.
 41. Kim, E.S., Kim, M.K. Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of persimmon, green tea and pine needle on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* 32: 337-352, 1999.
 42. Moon, S.H., Park, K.Y. Antimutagenic effects of boiled water extract and tannin from persimmon leaves. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 880-886, 1995.
 43. 박윤주, 강명희, 김종익, 박옥진, 이미숙, 장해동. Changes of vitamin C and superoxide dismutase(SOD)-like activity of Persimmon leaf tea by processing method and extraction condition. *한국식품과학회지* 27(3):281-285, 1995.
 44. 문숙희, 박건영. Antioxidative effect of Persimmon leaves. *한국식품영양과학회지* 13(1):53-55, 2000.
 45. 송현순, 이현걸, 강명희. Antimutagenic effects of persimmon leaf tea extract (PLTE) in mice using micronucleus induction (MN) Test. *한국식품영양과학회지* 29(5):881-887, 2000
 46. 김옥경. Effects of extracts of Diospyros kaki folium against hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. *한국식품영양과학회지* 30(1):97-101, 2001
 47. 박무희, 최청, 배만중. Effect of polyphenol compounds from Persimmon leaves (*Diospyros kaki folium*) on allergic contact dermatitis. *한국식품영양과학회지* 29(1):111-115, 2000.
 48. An, B.J., Kwak, J.H., Park, J.M., Lee J.Y., Park, T.S., Lee J.T., Son, J.H., Jo, C., Byun, M.W. Inhibition of enzyme activities and the antiwrinkle effect of polyphenol isolated from the persimmon leaf (*Diospyros kaki folium*) on human skin. *Dermatol Surg* 31(7 Pt 2):848-854, 2005.
 49. Shindo, Y., Witt, E., Packer, L. Antioxidants defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 100: 260-265, 1993.
 50. Masak, H., Atsumi, T., Sakurai, H. Detection of hydroxygen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 474-479, 1995.
 51. Pinkus, R., Weiner, L.M., Daniel, V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *Biol Chem* 271(23):13422-13429, 1996.
 52. Guyton, K.Z., Xu, Q., Holbrook, N.J. Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem J* 314(Pt 2):547-54, 1996.
 53. Schreiber, M., Baumann, B., Cotten, M., Angel, P., Wanger, E.F. Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J* 14: 5338-5349, 1995.
 54. Birkedal-Hansen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7: 728-735, 1995.
 55. Reynolds, JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 2: 70-76, 1996.
 56. Inomata, S., Matsunaga, Y., Amano, S., Takada, K., Kobayashi, K., Tsunenaga, M., Nishiyama, T., Kohno, Y., Fukuda, M., Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *J Invest Dermatol* 120: 128-134, 2003.