

자외선에 의한 세포손상에 대한 말채나무잎의 보호효과

박헌철·정택규·윤경섭[†]

(주)사임당화장품 기술연구소

(2014년 10월 13일 접수, 2014년 11월 9일 수정, 2015년 1월 5일 채택)

The Protective Effects of *Cornus walteri* Wanger Leaves against UV Induced Cellular Damage in Human Fibroblast

Hyun-Chul Park, Taek Kyu Jung, Kyung-Sup Yoon[†]

Saimdang Cosmetics Co. Ltd., R&D Center, 143, Yangcheongsongdae-gil, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Chungju-si, Chungcheongbuk-do 363-886, Korea

(Received October 13, 2014; Revised November 13, 2014; Accepted January 5, 2015)

요약: 말채나무는 한국의 민간요법으로 사용되던 약재이다. 자외선은 피부의 광손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 자외선에 의한 손상된 세포를 회복시키기 위해서 효소처리 된 말채나무잎추출물(CWE)을 사용하였다. 섬유아세포에 UVB를 조사한 후, CWE를 처리하여 세포의 회복을 조사하였다. UVB를 조사한 섬유아세포에는 caspase-3 활성, phospho-p53, γ H2AX, cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) formation, 그리고 DNA fragmentation이 증가하게 된다. 그러나 CWE를 UVB가 조사된 섬유아세포에 12 h 처리하였을 때 caspase-3 활성, phospho-p53, γ H2AX, CPDs formation, 그리고 DNA fragmentation이 감소하였다. 또한 CWE는 인체첨포시험을 통해 인체피부에 자극을 유발하지 않음을 확인하였다. 이러한 결과를 종합할 때 CWE는 자외선에 대한 광보호 효과가 있는 원료로서 가능성을 가지고 있다고 판단된다.

Abstract: *Cornus walteri* Wanger has been used in folk medicine in Korea. Ultraviolet (UV) irradiation has been known as a major cause of photo damage in skin. In the present study, research on how to cure damaged cells by UVB was conducted using an extract of *Cornus walteri* Wanger leaves (CWE), which was treated with an enzyme. CWE was applied to human dermal fibroblasts (HDFs) affected by UVB. UVB-irradiated HS68 cells showed increased caspase-3 activity, phosphorylation of p53, γ H2AX, cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) formation, and DNA fragmentation compared with non-irradiated cells. However, all these effects were inhibited by treatment with CWE for 12 h after UVB irradiation. Furthermore, CWE has proved not to cause primary skin irritation through the human patch test. Collectively, these results suggest that CWE could be a new potential candidate as photoprotective agent against UVB-induced cellular damage in HDFs.

Keywords: *Cornus walteri* Wanger, UVB-irradiation, human dermal fibroblast (HDF), apoptosis, photoprotection

[†] 주 저자 (e-mail: ksyoonjh@hanmail.net)
call: 043)218-4203

1. 서 론

피부는 외부에 노출되어 있어 자외선에 의한 손상을 받기 쉽다. 최근에는 오존층 감소로 UV 조사량이 많아 UV의 유해성에 대한 관심이 날로 증가하고 있다. 자외선은 파장에 따라 UVA (320 ~ 400 nm), UVB (280 ~ 320 nm), UVC (200 ~ 280 nm)로 구분되며, 이중 지표면에 도달하여 인체에 영향을 주는 자외선은 UVA와 UVB로 알려져 있으며 이 중에서 UVA의 약 20%, UVB의 10% 정도가 진피층에 도달하는 것으로 알려져 있다. 특히 UVB의 일부는 표피를 투과하여 진피의 유두층까지 도달하며 과도하게 조사되면 DNA 손상 및 돌연변이의 축적을 유발시킨다. 뿐만 아니라 홍반 반응, 일광화상(sunburn), 색소침착을 유발하여 광손상, 피부암 등을 일으킨다[1].

자외선을 직접적으로 흡수한 DNA는 pyrimidine 염기가 cross-link된 cyclobutane형인 CPD와 같은 특이적인 DNA 상해를 형성하게 되며 이러한 DNA 손상은 p53 단백질을 발현시켜 세포 주기를 일시적으로 정지시켜 회복할 수 있도록 한다. 그러나 세포가 손상을 회복하지 못하게 되면 세포자연사(apoptosis)에 관여하는 caspase-3 등의 단백질이 활성화되고 DNA fragmentation이 일어나면서 세포자연사가 일어난다[2,4]. 따라서 자외선 등으로부터 피부 세포를 보호하고 노화를 예방하기 위해서 천연물질을 이용한 광보호 효과 연구가 활발하게 진행되고 있다[5].

말채나무(*Cornus walteri* Wanger)는 층층나무과에 속하는 낙엽교목으로 잎은 호생하며 넓은 난형 또는 타원형이고 꽃은 6월에 피며 열매는 둥글고 9 ~ 10월에 흑색으로 익는다[6,7]. 한방에서는 말채나무의 가지와 잎을 모래지엽(毛楸枝葉)이라 하여 설사를 멈추거나 옷독을 치료하는데 사용하고 있으며, 민간에서는 말채나무 추출물을 살 빼는데 사용하였다. 말채나무의 생리활성 성분은 Choi 등이 말채나무껍질에서 gallic acid, (+)-gallo catechin, (+)-catechin, quercetin, quercitrin, rutin, isoquercitrin, hyperoside와 같은 8종의 phenol성 화합물을 분리 및 동정하였다[8]. Lim 등은 말채나무 에탄올 추출물이 식후 혈당상승을 억제하고 체중을 감소한다고 보고하였다[9]. 또한 Park과 Cha는 지질개선 효과와 간장 내 항산화효소 및 항염증 활성에 효과를 나타내어, 비만으로 인한 고지질 및 이와

관련된 대사성질환에 효능이 있을 것으로 보고했다[10]. 그러나 자외선에 의한 피부세포의 보호효과에 대한 연구는 없어 본 연구자들은 말채나무잎추출물을 이용하여 자외선에 조사된 피부세포에서 광보호 효과를 연구하게 되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료, 시약 및 기기

본 실험에 사용한 말채나무잎은 국내산으로 경기도 파주의 (주)지유본초로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지 및 시약은 Hyclone (Logan, USA), Sigma Aldrich (USA)로부터 구입하여 사용하였다. Triton-X 100, DMSO (dimethyl sulfoxide), paraformaldehyde, ethyl acetate는 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader, 형광분석 및 흡광도 측정은 Synergy^{HT} microplate reader (BIO-TEK, USA)를 사용하였다.

2.2. CWE의 제조

건조된 말채나무잎 50 g을 분쇄한 후, 75% ethanol 수용액 500 mL을 가하여 60 ~ 90 °C에서 2 h 동안 가열추출하고 여과하였다. 이 추출과정을 2회 반복하고 농축하여 조추출물을 얻었다. 이 조추출물을 10% ethanol 수용액에 다시 용해시키고 47 °C에서 20 h 동안 Novozyme[®]33095 (Novozyme, Denmark)를 가하여 배양하였다. 효소처리 배양액을 여과하고 농축한 후, 고형분 대비 1:10의 비율로 물에 분산시킨 후, 동량의 ethyl acetate를 가하고 분획, 농축하여 최종 CWE를 얻었다. 상기 추출물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 100 mg/mL로 용해시켜 스톱 용액을 제조하여 이용하였다.

2.3. 세포배양

세포주는 ATCC로부터 분양받은 HS68 cells을 사용하였으며, 세포배양에 사용된 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM)는 10% fetal bovine serum (Life Tech Inc., USA), 1% antibiotic antimycotic (100 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin, Life Tech Inc., USA)을 혼합한 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.4. 세포자연사(Apoptosis)의 측정

Cell death detection ELISA plus kit (Roche Applied Science, Germany)를 이용하여 세포자연사를 측정하였다. 실험방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. 6 well plate에서 배양중인 섬유아세포에 UVB (250 mJ/cm²)를 조사한 후 CWE를 다양한 농도로 첨가한 후 12 h 배양 후 트립신 처리하여 분리한 후 세척하고 1.5 mL tube로 옮겼다. 각 tube에 세포가 10⁴개씩 존재하도록 한 후 10 min간 원심분리 하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 후 각각의 well에 200 µL의 용해 완충액을 첨가하여 15 ~ 25 °C에서 30 min간 반응시켰다. tube를 다시 10 min간 원심 분리 후 각각의 상층액 20 µL를 streptavidin이 코팅된 96 well plate에 옮겼다. 각각의 well에 면역 반응액을 80 µL씩 첨가한 후 덮개 호일로 감싼 후 300 rpm에서 15 ~ 25 °C의 온도에서 2 h 동안 반응 시켰다. 용액을 제거하고, 반응액으로 3회 세척 후, 각각의 well에 ABTS 용액을 100 µL씩 첨가하고 250 rpm으로 약 10 ~ 20 min 동안 충분한 발색 반응이 보일 때까지 반응시켰다. 405 nm에서 ELISA 판독기로 흡광도를 측정하였다.

2.5. Caspase-3 활성 측정

Caspase-3 활성의 측정은 Abcam사에서 제공하는 caspase-3 assay kit을 이용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, UVB (250 mJ/cm²)를 조사한 섬유아세포에 CWE를 12 h 처리한 후 PBS로 세척하여 lysis buffer를 넣고 4 °C에서 10 min간 방치한 다음 10,000 g로 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액은 caspase-3 activity assay kit을 활용하여 Abcam사에서 제공하는 방법에 준하여 수행하였으며, microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. H2A.X (pSer139) 측정

H2A.X (pSer139)의 측정은 Abcam사에서 제공하는 H2A.X (pSer139) assay kit을 이용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, UVB (250 mJ/cm²)를 조사한 섬유아세포에 CWE를 12 h 처리한 후 PBS로 세척하여 4% paraformaldehyde로 고정한다. 고정한 세포는 PBS로 세척 후 Triton-X 100에 10 min간 방치하여 permeabilization 하였다. 이후 상온에서 Blocking solution

에 담가 2 h 방치하고, 이어 Blocking solution으로 희석된 1차 항체(anti-H2A.X (pSer139))와 4 °C에서 overnight 반응시켰다. 이후 washing buffer로 세척하고 형광이 결합된 2차 항체와 상온에서 2 h 반응시켰다. 이후 washing buffer로 세척하고 다시 PBS로 세척한 후 Janus Green Stain을 넣고 5 min간 실온에서 반응시켰다. 그리고 탈이온수를 이용하여 세척하고 0.5 mM HCl을 넣고 microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. CPD 측정

자외선에 의한 DNA 손상의 정도를 확인하기 위하여 시판 중인 OxiSelect™ Cellular UV Induced DNA Damage Staining Kit (CPD) (Cell Biolabs Inc, USA)를 이용하여 제조사 설명서에 따른 비색정량법(colorimetric determination)을 통해 측정하였다.

2.8. Phospho-p53 (p-p53) 측정

UV에 의한 세포 손상으로 인하여 발현하는 p-p53의 양을 측정하기 위해서, 섬유아세포에 UVB (250 mJ/cm²)를 조사한 후 CWE를 1, 20, 50 µg/mL으로 처리하여 12 h 배양하였다. 배양된 세포를 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Bio Technology, Korea)로 균질 분쇄한 뒤 10 min간 vortex한 후 4 °C에서 12,000 rpm로 30 min 원심분리하여 상층액을 취하여 단백질양을 측정하였다. 그리고 동량의 단백질을 이용하여 p-p53의 발현을 Cell Signaling사에서 제공하는 Sandwich ELISA kit을 이용하여 측정하였다.

2.9. 피부안전성 시험

CWE에 대한 피부 안전성, 즉 피부반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생 여부를 알아보기 위하여 (주)더마프로에 의뢰하여 인체척포시험을 실시하였다. 피험자로 18세 이상 60세 이하의 건강한 성인 남, 여 30명을 선정하였다. 우선, 척포부위인 등을 70% EtOH로 세척한 후, 준비된 시험물질을 Finn chamber®내에 16 µL를 적하시켰다. 첩보는 48 h 동안 도포하며, 첩포를 제거한 후에는 skin marker로 시험부위를 표시하고 30 min, 24 h 후에 각 시험부위를 평가하였다. 평가기준은 Frosch & Kligman법과 The Cosmetic, Toiletry, and Frangrance Association (CTFA)

Table 1. Human Primary Irritation Index for Cosmetic Products

Average reaction	Evaluation creatia
$0.00 \leq R < 0.9$	Slight
$0.87 \leq R < 2.42$	Mild
$2.42 \leq R < 3.44$	Moderate
$3.44 \leq R$	Severe

guideline을 반영하여 평가하였다[11-13].

척포 부착 후 48 h과 72 h에 판독한 결과의 피부반응도를 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Response} = \frac{\Sigma(\text{Grade} \times \text{No. of Responders})}{4(\text{Maximun Grade}) \times (\text{Total Volunteers})} \times 100 \times \frac{1}{2}$$

상기 계산식에 의해 계산되는 피부반응도를 미리 정한 다음의 Table 1의 판정기준에 준하여 각 시료의 피부반응도를 판정하였다.

2.10. 통계처리

모든 실험 결과는 평균 \pm 오차(mean \pm SE)로 표기하였고 통계처리는 Student's *t*-test로 검정하였고 대조군과 비교하여, $p < 0.05$ 인 경우 *, $p < 0.01$ 인 경우 **로 유의성이 있다고 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. CWE의 세포자연사(Apoptosis)의 측정

본 연구에서는 CWE가 섬유아세포인 HS68 cells의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 이용한 세포생존율을 측정하였다. CWE 처리군은 세포생존율이 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 HS68 cells의 세포 독성에 영향을 미치지 않는 것으로 확인하였다(data not shown). 따라서 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 이하에서 UVB에 대한 세포 보호효과 실험을 진행하였다. 먼저 HS68 cells에 UVB (250 mJ/cm^2)를 조사한 후 CWE 처리에 의한 세포자연사 정도를 측정하였다(Figure 1). UVB 단독 처리군에 비하여 세포자연사가 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 18%, 33% 억제되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 CWE가 UVB에 의해 야기된 피부 세포의 광손상으로

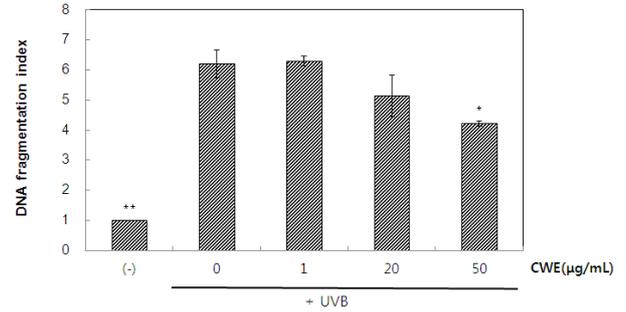


Figure 1. Protective effect of CWE against UVB-induced apoptosis in HS68 cells. HS68 cells was irradiated with UVB, and then treated with CWE (0, 1, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The cells were harvested after 12 h and Apoptosis was measured by cell death detection ELISA plus kit (Roche applied science). Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to UVB irradiated group.

부터 세포자연사를 막고 회복 가능성을 보여준다.

3.2. CWE의 Caspase-3 활성의 측정

세포자연사는 caspase의 관여 유무에 의해 caspase 의존적인 세포자연사와 caspase 비의존적인 세포자연사로 구분된다[14]. Xu 등은 UVB에 의한 세포자연사에 있어 caspase 의존적으로 일어나며 특히 caspase-3 활성화에 의해 유도된다고 보고하였다[15].

UVB를 조사하지 않은 군에서는 caspase-3의 활성이 미미한 반면에 UVB를 조사한 군에서는 caspase-3의 활성이 확연하게 증가하는 것을 볼 수 있었다. CWE를 1, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 처리했을 때 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 caspase-3 활성이 각각 37%, 44%로 유의성 있게 감소하였다(Figure 2). 이러한 결과는 CWE가 UVB에 의해 야기된 피부 세포의 광손상으로 일어나는 세포자연사 억제 가능성을 제시한다.

3.3. CWE의 H2A.X (pSer139) 형성 측정

H2A.X는 histone H2Ab family 중 하나로 DNA double-strand break가 일어나면 H2A.X의 C-terminal tail에 존재하는 Ser 139이 인산화 되어 γ -H2AX 형태로 바뀌게 된다[16]. Barnes 등은 자외선에 의한 피부 세포손상으로 세포 자연사가 발생할 때 γ -H2AX가 증가하고 DNA ladder 형성에 있어서 γ -H2AX가 필요하다고 보고하였다[17-19]. 따라서 본 연구에서 CWE가 UVB에 의하여 손상된 세포의 자연사에서 DNA에 미치는 영

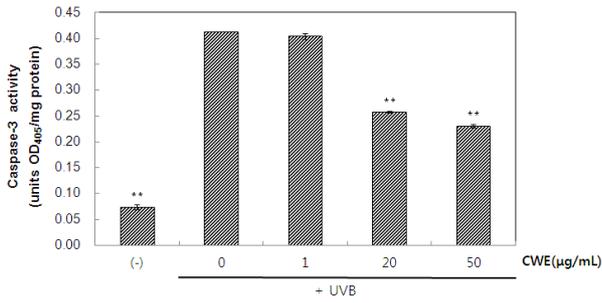


Figure 2. Effect of CWE on caspase-3 activity in UVB-exposed HS68 cells. HS68 cells were treated with extract of CWE after UVB irradiation. After 12 h, caspase-3 activity was measured as described in Materials and Methods. Values are mean ± SE. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 compared to UVB irradiated group.

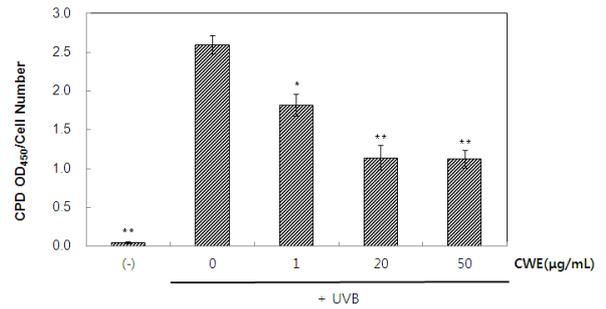


Figure 4. Effect of CWE on UVB-induced DNA damage in HS68 cells estimated as CPD formation. HS68 cells was irradiated with UVB, and then treated with CWE (0, 1, 20, 50 µg/mL). CPD formation was measured by ELISA. Values are mean ± SE. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 compared to UVB irradiated group.

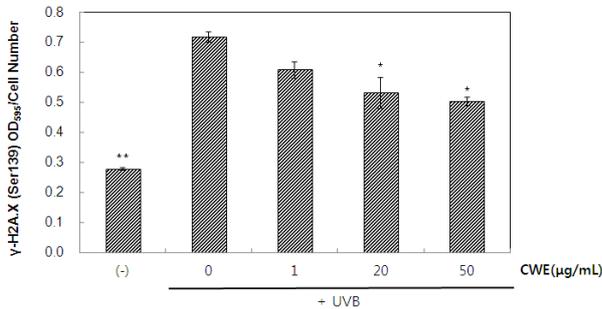


Figure 3. Effect of CWE on γ-H2AX formation in UVB-exposed HS68 cells. HS68 cells was irradiated with UVB, and then treated with CWE (0, 1, 20, 50 µg/mL). After 12 h, γ-H2AX formation was measured by ELISA. Values are mean ± SE. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 compared to UVB irradiated group.

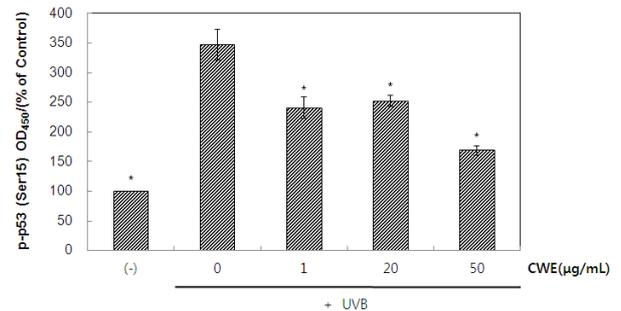


Figure 5. Effect of CWE on the level of phospho-p53 in UVB-exposed HS68 cells. HS68 cells was irradiated with UVB, and then treated with CWE (0, 1, 20, 50 µg/mL). The cells were harvested after 12 h and Level of serine 15-phosphorylated p53 was measured by ELISA. Values are mean ± SE. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 compared to UVB irradiated group.

향을 관찰하고자 In-cell ELISA assay를 시행하여 H2A.X의 생성량을 측정하였다. Figure 3에서 보는 바와 같이 본 연구에서도 UVB만 단독으로 처리한 군에서는 γ-H2AX이 확연하게 증가하였으며 UVB의 자극한 세포에 CWE 20, 50 µg/mL 처리한 군에서는 γ-H2AX 형성이 각각 25%, 29%로 유의성 있게 감소하였다.

3.4. CWE의 CPD 형성 측정

Thymine이 연속된 DNA 서열에 자외선이 가해지면 CPD가 형성하게 된다[2]. 따라서 CWE가 DNA 상해 반응에 미치는 영향을 확인하기 위해서 CPD 잔여량

을 측정하여 분석하였다. 그 결과, Figure 4에서 보는 바와 같이, 자외선을 조사한 후 CWE를 처리한 경우 농도 의존적으로 CPD 양이 유의적으로 감소하였다. 자외선에 의한 세포자연사로부터 보호하는 효과뿐만 아니라 DNA 상해 반응 회복의 효과까지 나타나고 있다.

3.5. CWE의 p-p53 발현 측정

Figures 3, 4에서 CWE에 의한 DNA 손상이 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 CWE가 DNA 손상에 의한 세포자연사에 있어 p53의 인산화에 미치는 영향을 알아보기 위해서 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.

Table 2. Skin Irritation Index of CWE

Sample	48 h			72 h			Reaction grade		
	1+	2+	3+	1+	2+	3+	48 h	72 h	Mean
CWE (0.5% in Propanediol)	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

Figure 5에서 보는 바와 같이, 자외선을 처리하지 않았을 때는 p53의 인산화가 미미하였지만 자외선을 조사하였을 때 p53의 인산화가 현저하게 증가하였다. Latonen 등의 보고에서도 자외선에 의해 DNA의 손상은 p53의 인산화가 일어나는 것으로 보고하고 있다 [20]. 자외선을 조사한 후 CWE를 1, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 군에서 UVB만 처리한 군보다 p53의 인산화가 각각 30%, 27%, 51%로 억제되었다.

3.6. 피부자극 평가

*In vitro*에서 광보호 효과가 있는 CWE에 대해 인체 피부에서의 피부자극 정도를 평가하기 위하여 인체접촉시험을 실시하였다. 0.5% CWE농도로 적용한 피험자 30명에 대해서 48 h 및 72 h의 평균 반응도를 측정하였으며, 피험자 모두에서 음성반응을 보였다(Table 2). CWE는 *in vitro*에서의 세포독성 결과와 인체시험 결과를 종합해 볼 때, 저자극 소재로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 CWE가 섬유아세포에서 자외선에 대한 피부 광보호 효과 실험을 실시하였다. 먼저 UVB에 대한 세포자연사 정도를 측정하기 위해서 DNA fragmentation을 측정하였다. 그 결과 CWE 농도 의존적으로 DNA fragmentation 형성이 감소되는 것을 확인하였다. 그리고 세포자연사와 관련성이 있는 H2A.X 인산화와 p-p53은 1, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 농도 의존적으로 감소하였으며 caspase-3의 활성은 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 UVB만 조사한 군보다 유의성 있게 감소하였다. 자외선에 의한 DNA 손상과 관련된 CPD 형성 억제의 경우에는 1, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 농도 의존적으로 형성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 피부 자극성의 유무를 확인하기 위하여 인체접촉시험을 실시한 결과 피험자 모두에서 음성반응으로 나왔다. CWE의

광보호 및 안전성의 연구결과를 종합해 볼 때 자외선에 의한 세포자연사를 억제하고 또한 DNA 손상을 회복하여 광보호 효과에 활용할 수 있는 바이오산업 소재로서의 활용 가치가 높다고 사료된다. 향후에는 본 연구 결과를 토대로 하여 CWE가 p53 경로와 관련이 있는 GADD45, p21, MDM2 등의 발현 양상 변화에 대한 추가 연구를 하고자 한다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: HN10C0004).

Reference

1. H. Matz, UV light and its interaction with cutaneous receptors, *Dermatol. Clin.*, **25**, 633 (2007).
2. H. L. Lo, S. Nakajima, L. Ma, B. Walter, A. Yasui, D. W. Ethell, and L. B. Owen, Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest, *BMC Cancer*, **5**, 135 (2005).
3. S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.*, **35**(4), 495 (2007).
4. S. Haupt, M. Berger, Z. Goldberg, and Y. Haupt, Apoptosis - the p53 network, *J. Cell Science*, **116**, 4077 (2003).
5. A. Svobodová, J. Psotová, and D. Walterová, Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage, *A review. Biomed. Papers*, **147**(2), 137 (2003).
6. C. B. Lee, Coloured Flora of Korea, 594, Hyangmunsa, Seoul (1989).
7. W. G. Lee, Coloured standard illustrations of Korean plants, 249, Dosuh Press, Seoul (1996).

8. W. H. Choi, W. Y. Park, B. Y. Hwang, G. J. Oh, S. J. Kang, K. S. Lee, and J. S. Ro, Phenolic compounds from the stem bark of *Cornus walteri* Wnager, *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**, 217 (1998).
9. C. S. Lim, C. Y. Li, Y. M. Kim, W. Y. Lee, and H. I. Rhee, The inhibitory effect of *Cornus walteri* extract against α -amylase, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **48**, 103 (2005).
10. W. H. Park and Y. Y. Cha, Effect of stem bark extracts of *Cornus walteri* Wanger on the lipid lowering, anti-oxidative activity and concentration of proinflammatory cytokines in rat fed high fat diet, *J. Oriental Rehab. Med.*, **19**, 59 (2009).
11. P. J. Frosch and A. M. Kligman, The soap chamber test, A new method for assessing the irritancy of soaps, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1**(1), 35 (1979).
12. CTFA Safety Testing Guideline: The Cosmetic, 20005, Toiletry and Fragrance Association, Inc. Washington, D. C. (1981).
13. CTFA Safety Testing Guideline: The Cosmetic, 20036 Toiletry and Fragrance Association, Inc. Washington, D. C. (1991).
14. L. E. Broker, A. E. Kruyt, and G. Giaccone, Cell death independent of caspases: a review, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3155 (2005).
15. H. Xu, Y. Yan, L. Li, S. Peng, T. Qu, and B. Wang, Ultraviolet B-induced apoptosis of human skin fibroblasts involves activation of caspase-8 and -3 with increased expression of vimentin, *Photodermatol. Photoimmunology. Photomed.*, **26**(4), 198 (2010).
16. E. P. Rogakou, D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J. Biol. Chem.*, **273**, 5858 (1998).
17. L. Barnes, M. Dumas, M. Juan, E. Noblesse, A. Tesniere, S. Schnebert, B. Guillot, and J. P. Molès, Gamma H2AX, an accurate marker that analyzes UV genotoxic effects on human keratinocytes and on human skin, *Photochem. Photobiol.*, **86**(4), 933 (2010).
18. C. Lu, F. Zhu, Y. Y. Cho, F. Tang, T. Zykova, W. Y. Ma, A. M. Bode, and Z. Dong, Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3, *Mol. Cell*, **23**(1), 121 (2006).
19. E. P. Rogakou, W. Nieves-Neira, C. Boon, Y. Pommier, and W. M. Bonner, Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139, *J. Biol. Chem.*, **275**, 9390 (2000).
20. L. Latonen, Y. Taya, and M. Laiho, UV-radiation induces dose- dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts, *Oncogene*, **20**(46), 6784 (2001).