

사람 피부 섬유아세포에서 자외선으로 유도된 기질분해효소-1과 기질분해효소-3의 발현 유도에 대한 사상자 추출물의 억제효과

노은미 · 송현경 · 김정미 · 이금산¹ · 권강범^{2*} · 이영래*

원광대학교 치과대학 구강생화학교실, 1: 한의과대학 본초학교실, 2: 한의과대학 한방생리학교실

Extracts of *Torilis Japonica* Suppresses of Ultraviolet B-induced Matrix Metalloproteinase-1/-3 Expressions in Human Dermal Fibroblasts

Eun Mi Noh, Hyun Kyung Song, Jeong Mi Kim, Guem San Lee¹, Kang Beom Kwon^{2*}, Young Rae Lee*

Department of Oral Biochemistry, and Institute of Biomaterials, Implant, College of Dentistry, Wonkwang University,

1: Department of Herbology, College of Korean Medicine, Wonkwang University

2: Department of Korean Physiology, College of Korean Medicine, Wonkwang University

Torilis Japonica (TJ) has been used as an anti-allergy, antifungal, and antibacterial agent. Recent studies have reported that it also shows anti-cancer effects. It is report that TJ inhibits melanin synthesis in melanocyte in the skin. However, the effect and mechanism of TJ extract (TJE) on Ultraviolet (UV)B-induced photoaging are unknown. In this study, we investigated the preventive effects of TJE on matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 expressions and the underlying molecular mechanism in UVB-irradiated primary human dermal fibroblasts (HDFs). The effect of TJE on HDF cell viability was determined using the XTT assay and cell counting. MMP-1 and MMP-3 expressions levels were measured by western blotting and real-time PCR analysis. Activations of mitogen-activated protein kinase (MAPKinase), nuclear factor- κ B (NF- κ B), and activator protein-1(AP-1) were measured by western blotting. Our results showed that TJE effectively reduced UVB-induced MMP-1 and MMP-3 protein and mRNA levels. Moreover, TJE significantly blocked the UVB-induced activation of MAPK (p38 and JNK) and transcription factors (NF- κ B and AP-1), but not ERK. Taken together, our results suggest that the TJE inhibits UVB-induced MMP expressions in HDFs and its may be a potential agent for the prevention and treatment of skin photoaging.

keywords : *Torilis Japonica*(蛇床子), photoaging, MMPs, NF- κ B, AP-1

서 론

여러 환경적 요인에 노출되어 나타나는 피부 노화를 외인성 피부 노화라고 한다. 외인성 노화의 중요 인자로는 태양광이 잘 알려져 있는데¹⁾, 태양광에 노출된 피부 또는 자외선이 조사된 배양된 사람피부세포에서는 기질분해효소들(matrix metalloproteinases (MMPs))양이 증가하고 콜라겐 합성이 감소하여 피부노화가 유도된다고 알려졌다^{2,3)}. MMPs는 결합조직에서 콜라겐기질을 분해하는데, 그 중에서 MMP-1은 섬유콜라겐을 분해하고, MMP-3는 넓은 범위의 세포외기질을 붕괴시켜 피부노화에 중요한 역할을 한다고

알려져 있다⁴⁾. 따라서 자외선에 의한 피부노화 예방 또는 치료에 MMP 발현 증가 억제제는 좋은 표적 물질로 관심을 받고 있다. 천연물은 화학적 물질이 가지고 있는 경제성, 독성, 부작용등의 단점에 의해 더 나은 후보물질로 관심을 받고 있고, 많은 논문에서 다양한 천연물들이 MMP 억제에 효과가 있다고 보고되고 있다^{5,6)}.

*Torilis japonica*는 예전부터 항알러지, 항곰팡이, 항박테리아 등의 효능으로 사용되어 왔고, 최근연구 결과에는 항암효과도 가지고 있다고 보고되었다^{7,8)}. 또한, 피부와 관련되어서는 melanocyte에서 멜라닌 합성을 억제한다는 보고가 있으나⁹⁾, 자외선에 의한 피부노화에 대해서는 전혀 보고되어 있지 않다.

* Corresponding author

Kang Beom Kwon, Department of Korean Physiology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, Korea

·E-mail : dession@wku.ac.kr ·Tel : +82-63-850-6917

Young-Rae Lee, Department of Oral Biochemistry, and Institute of Biomaterials, Implant, College of Dentistry, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, Korea

·E-mail : mindyr@wku.ac.kr ·Tel : +82-63-850-6996

·Received : 2018/12/06 ·Revised : 2019/05/17 ·Accepted : 2019/06/12

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.06.33.3.175>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

자외선에 노출된 사람섬유아세포에서 MMPs 발현의 유도는 mitogen-activated protein kinase (MAPKinase) 활성화에 의한 nuclear factor- κ B (NF- κ B)와 activator protein-1(AP-1) 전사인자들의 활성화로 인해 유도된다고 잘 알려져 있다⁴⁾. 이전 보고들에서 Torilis japonica extract (TJE)는 MAPKinase와 NF- κ B와 AP-1 전사인자의 활성을 억제함을 보여 주었다^{10,11)}. 따라서 본 연구에서는 자외선에 의한 MMP-1과 MMP-3 활성화에 TJE의 억제 효과가 있을 것으로 사료되어, 효과와 그 기전을 관찰하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 재료

사람 피부에서 분리한 피부 섬유아세포 neonatal human dermal fibro blasts (HDFs)는 GIBCO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 회사에서 구입하여 사용하였으며, DMEM 배지에 10 % 소 배아 혈청과 1 % 항생제를 첨가하여 사용하였고 37°C, 5 % CO₂가 든 incubator에서 배양하였다. MMP-1과 MMP-3 항체는 R&D Systems (R&D systems, Minnea polis, USA)에서 구입하였다. β -actin 항체는 SIGMA에서 구입하였다. 일차항체 phospho(p)-p38, p-ERK, p-JNK, p38, ERK, JNK 그리고 p-c-Jun은 cell signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 일차항체 proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p65, p50, 그리고 I κ B α 및 이차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. High glucose-containing DMEM, 소배아혈청, 항생제, trypsin 그리고 phosphate-buffered saline (PBS)는 Gibco-BRL에서 구입하였다.

2. 사상자 추출물의 분리

사상자는 광명당(울산, 대한민국)에서 구입한 후 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 진품 여부를 검증 받았으며, 추출물을 아래와 같이 분리하였다. 사상자 100 g을 1000 ml의 증류수에 2 시간 동안 100 °C에서 전탕 후 무형광 솜을 이용하여 여과한 후 침전물이 생기지 않도록 45 °C에서 Rotary Evaporator(N-10 00SWD, EYELA, JAPAN)를 이용하여 농축한 다음 건조하여 6.8477g을 획득하여 4°C에서 보관하면서 물에 녹여 실험에 사용하였다.

3. 자외선 조사

HDF는 PBS로 두 번 세척한 후 소량의 PBS를 넣고 UV crosslinker (6×8 W, 312 nm, Model CL-508M, Vilber Lourmat, Paris, France)를 이용하여 UVB 25 mJ/cm²를 조사해 주었다. 자외선 조사 후 바로 사상자가 함유된 serum-free 배지를 넣어 주고 배양시켰다. 배양시간은 각 실험 조건에 맞추어 진행되었다. 대조군 세포는 UVB 조사만 없이 같은 배지 조건에 노출되었다.

4. 추출물의 세포 독성 측정

사상자의 농도에 대한 세포 생존율에 대한 영향은 EZ-Cytox Enhanced Cell Viability Assay Kit (DOGEN, Seoul, Korea)를

사용하여 제공되는 방법에 따라서 측정하였다. HDFs에 농도별 사상자를 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 EZ-cytox를 10 μ l/well 씩 넣어주고, 37°C 배양에서 30분 반응시켰다. 반응 후 ELISA reader (SunriseTM; Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 450 nm 흡광도를 측정하였다. 자외선 자극에 의한 세포 생존율에 대한 사상자의 영향을 살펴보기 위해 HDFs에 25 mJ/cm² UVB를 조사한 후 사상자를 처리하고 24시간 배양하였다. 배양 후 세포를 trypsin처리에 의해 배양접시에서 떼어 낸 후 trypan blue 염색 후 hemocytometer에서 염색되지 않은 세포를 counting 하여 측정하였다. 세포수는 다음 식으로 결정하였다.

$$\text{Cells/ml} = \text{average count per square} \times \text{dilution factor} \times 10^4$$

실험 결과는 mean \pm S.E.M으로 표시하였다.

5. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

HDFs에 UVB 25 mJ/cm²를 조사한 후 사상자 추출물을 처리하고 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 세포내 단백질 분리는 Radioimmuno precipitation assay buffer (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하였다. 20 μ g의 단백질은 전기영동을 시행하여 분리하였고, Hybond™-polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)에 이동하였다. 일차항체는 1 : 1000으로 희석하여 사용하였고, 단백질 발현량은 image analyzer (Uvitex, Cambridge, UK)를 사용하여 확인하였다.

6. 실시간 역전사 효소 중합반응 (Quantitative real-time polymerase chain reaction - Real time RT-PCR)

Trizol Reagent (Life Technology, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였고, Prime-Script™ RT reagent Kit (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 제품 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. Real time RT-PCR (Applied Biosystems, USA)을 수행하여 MMP-1과 MMP-3 유전자 발현량을 확인하였고, housekeeping gene (GAPDH)과 비교하여 정량화하였다. MMP-1 (NM 002424.2) primer: sense, 5'-AGTGACTGGGAACCGATGCTGA-3' and antisense, 5'-CTCTTGGCAAATCTGGCCTGTAA-3'; MMP-3 (NM 002422) primer: sense, 5'-ATTCCATGGAGCCAGGCTTTC-3' and anti sense, 5'-CATTTGGGTCAAACCTCAACTGTG-3' and GAPDH (NM 002046) primer: sense, 5'-ATGGAAATCCC ATCACCATCTT-3' and anti sense, 5'-CGCCCACTTGATTT TGG-3'. 이를 One-Way ANOVA test (Microcal Origin; version 6.0; Microsoft; USA)를 이용하여 유의성을 검증하였다. 그리고, p < 0.05인 것만 유의한 것으로 하였다.

7. 핵과 세포질 단백질 분리 (Preparation of nuclear extract and cytosolic extract)

HDFs에 UVB 25 mJ/cm²를 조사한 후 사상자 추출물을 3시간 동안 처리하였다. 차가운 PBS로 세척 후, cytoplasmic과 nuclear extract 분리는 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, Rockford, USA)를 사용하여 제품

매뉴얼에 따라서 수행하였다.

결 과

1. HDFs에서 사상자 추출물의 세포 독성 에 미치는 영향 확인

사상자 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 HDFs에 다양한 농도로 처리한 후 24시간 배양하였다. 그 후 세포 생존율을 EZ-Cytox Enhanced Cell Viability Aassay Kit를 사용하여 측정 한 결과 100 µg/ml까지 유해한 영향은 나타나지 않았다(Fig. 1A). 따라서 본 실험은 25 µg/ml과 50 µg/ml의 농도를 최적농도로 설정하여 다음 실험을 진행하였다. 우선, UVB가 유도하는 세포 독성 에 대한 사상자 추출물의 세포 보호 효과를 확인하기 위하여, HDFs에 UVB 25 mJ/cm²을 조사 후 25 µg/ml과 50 µg/ml의 사상자 추출물을 세포에 처리 한 후 24 시간 배양 후 trypan blue 염색을 하였다. 염색되지 않은 세포를 살아있는 세포로 판단하여 그 개수를 세어 확인하였다. 그 결과 UVB에 대한 세포 독성이 사상자 추출물 처리에 의해 보호되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

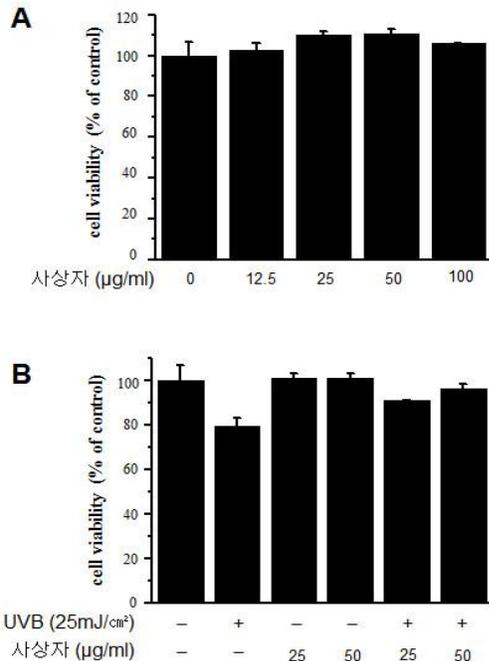


Fig. 1. Effect of TJE on cell viability in HDFs. (A) HDFs were treated with 25 µg/ml and 50 µg/ml of TJE for 24 h. Cell viability assay was determined by EZ-Cytox Enhanced Cell Viability Aassay Kit. (B) HDFs were irradiated with UVB 25 mJ/cm² and treated with 25 µg/ml and 50 µg/ml TJE for 24 h. After incubation, cells were stained with trypan blue and non-stained cells were counted under an optical microscope using a hemocytometer. Cell Data represents the mena±S.E.M. of three independent.

2. 사상자 추출물의 UVB 유도 MMP-1 과 MMP-3 에 대한 효과

자외선에 의한 피부노화에서 MMPs의 발현은 하나의 표지자 및 표적 유전자로 알려졌다^{4,5}. 따라서, HDFs에서 UVB 조사에 의해 유도되는 MMP-1과 MMP-3 발현 증가에 대한 사상자 추출물의 효과를 확인하였다. UVB 조사에 의해 증가된 MMP-1과 MMP-3 단백

질 발현은 사상자 추출물 처리에 의해 효과적으로 억제되었다 (Fig. 2A). 또한 Real time PCR 방법을 이용하여 mRNA 발현을 조사한 결과 사상자 추출물이 UVB 조사에 의해 증가하는 MMP-1과 MMP-3의 mRNA 발현을 유의하게 억제함을 확인하였다(Fig. 2B).

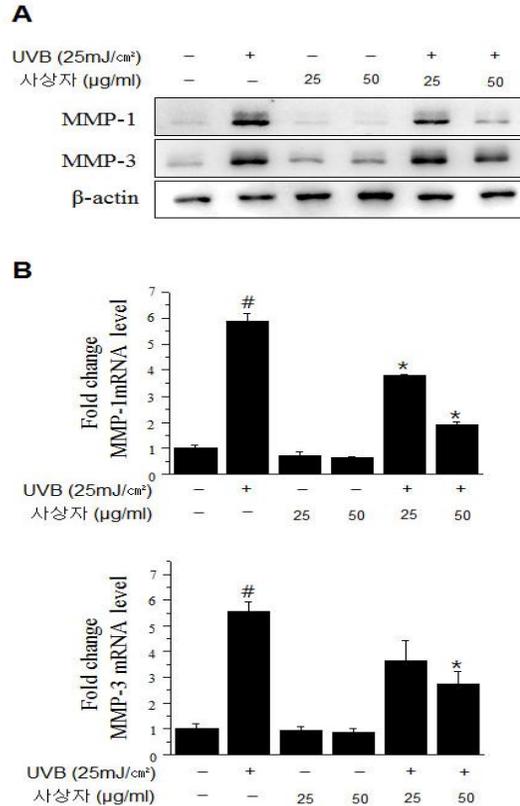


Fig. 2. TJE suppresses UVB-induced expression of MMP-1 and MMP-3 in HDFs. HDFs were irradiated with UVB and treated with 25 µg/ml and 50 µg/ml TJE for 24 h. (A) Total cellular protein was analysed by western blotting with anti-MMP-1 and anti-MMP-3. A anti-β-actin was used for confirm equal loading. (B) The MMP-1 and MMP-3 mRNA levels were measured using real-time qPCR method. Each value represents the mean ± the SME of three independent experiments. #P<0.05 vs untreated control; *P<0.05 vs UVB

3. 사상자 추출물의 UVB 유도 MAPKinase 활성화에 대한 효과

UVB 유도에 의한 MMPs 발현에 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려진 NF-κB와 AP-1은 MAPKinase에 의해 활성화된다고 알려져 있다. MAPKinase는 p38, ERK와 JNK로 구성되어 있으며, UVB 자극에 의해 활성을 가진 인산화 형태가 유도된다고 알려져 있다¹⁰. 따라서, 사상자 추출물의 UVB-induced MAPKinase 활성화에 대한 영향을 확인하기 위하여, western blot 방법을 이용하여 MAPKinase 인산화를 측정하였다. 그림 3에서 보는 것과 같이 UVB 조사는 MAPKinase 구성원인 p38, ERK, JNK의 인산화를 매우 효과적으로 증가시키며, 사상자 추출물의 처리는 ERK를 제외한 p38과 JNK의 인산화를 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

4. 사상자 추출물의 UVB 유도 NF-κB와 AP-1 활성화에 대한 효과

사상자 추출물의 MMP-1과 MMP-3 억제 효과의 세포 내 기전

을 더 명확하게 하기 위하여 전사인자 활성화에 대한 영향을 확인하였다. 그 결과 UVB 조사에 의해 세포질 내 NF- κ B 조절 매개체인 I κ B α 의 붕괴에 의해 NF- κ B의 구성 인자인 p65와 p50의 세포질에서 핵으로의 이동 증가에 의해 NF- κ B의 활성화가 증가되고, 핵내 AP-1의 구성 인자인 c-Jun의 인산화 증가에 의해 AP-1의 활성화가 증가되었다. 이러한 UVB에 의한 NF- κ B와 AP-1활성 증가를 사상자 추출물 처리에 의해서 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 4).

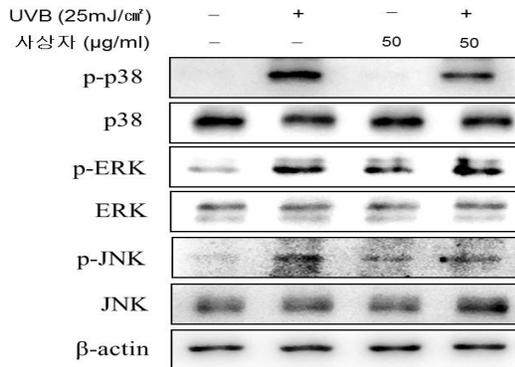


Fig. 3. TJE inhibits UVB-induced MAPKinase activation in HDFs. Cells were irradiated with UVB and treated with TJE for 30 min. The cell lysates were analysed by western blotting with indicated antibodies.

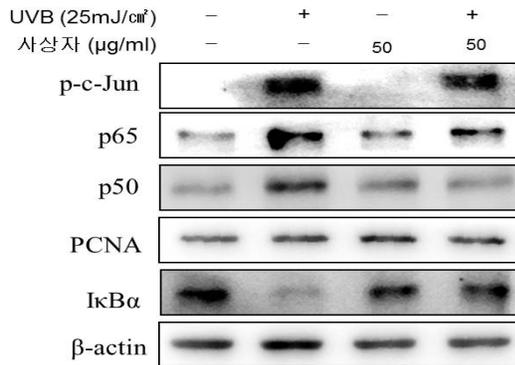


Fig. 4. TJE inhibits UVB-induced NF- κ B and AP-1 activation in HDFs. HDFs were irradiated with UVB and then TJE was added. After 3 h, cells were separated into nuclear and cytoplasmic fractions. Expressions of p-c-Jun, p65, p50 and PCNA in nucleus and I κ B α and β -actin in cytoplasm were determined by western blotting.

고 찰

자외선은 세 가지 종류를 가지는데, 320-400nm 파장의 자외선을 UVA, 280-310nm 파장의 자외선을 UVB, 그리고 200-280nm 파장의 자외선을 UVC라 한다. 그 중 UVA와 UVB는 지구 표면에 도달하여 사람의 피부에 흡수될 수 있다고 알려졌다¹²⁾. 그 중 UVB 파장은 표피층을 관통 할 수 있고 상부 진피에 거의 완전히 흡수되어 피부 각질 세포와 피부 섬유아세포에서 손상을 준다고 알려져, 자외선 중에 가장 생물학적으로 유해한 유형으로 알려져 있다^{13,14)}. 자외선에 의한 피부의 광노화는 다양한 병리학적인 변화를 특징으로 하는데, 피부의 주름 형성은 광노화의 주목할 만한 특징이며, MMPs는 피부의 다양한 세포 (표피세포, 섬유아세포,

염증세포 등)에서 분비되며, 결합조직에 손상을 주어 피부노화를 나타낸다고 알려졌다¹⁵⁻¹⁷⁾. 많은 연구에서 UVB 자극에 의해 MMPs의 발현이 유도된다고 보고되어 있으며, 최근 연구에는 MMPs를 조절하는 기전에 대한 연구에 많은 관심이 집중되어 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

따라서 본 저자는 UVB 노출 후 유도되는 MMP-1과 MMP-3 발현 조절에 있어 사상자 추출물의 효과와 신호 기전에 초점을 두었다. 본 연구에서 HDFs에서 사상자 추출물의 처리가 UVB에 의해 유도되는 MMP-1과 MMP-3의 발현을 억제하는 것을 보여주었다(Fig. 2). 이러한 결과는 사상자 추출물이 자외선에 의한 피부 노화 예방 및 치료효과가 있을 것임을 시사한다.

MAPKinase 신호경로는 세포성장과 사멸에 관여하는 중요한 신호경로 단백질로, 사이토카인과 MMP 생성 조절에도 관련되어 있다고 알려져 있다^{21,22)}. MAPKinase 억제제가 자외선 유도 MMP 발현 억제한다는 연구결과를 봐도 알 수 있듯이 자외선에 의한 피부 노화에서도 중요 신호경로 단백질로 알려져 있다²³⁾. 본 연구에서 사상자 추출물은 p38과 JNK 두 가지 MAPKinase 활성을 억제하는 것을 보여주었다(Fig. 3). 또한, NF- κ B와 AP-1은 자외선에 의한 피부세포 노화에서 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있으며¹⁰⁾, 본 연구 결과에서도 사상자 추출물은 UVB에 의해 활성화되는 두 전사인자의 활성을 억제하였다(Fig. 4). 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 사상자 추출물은 자외선에 의한 피부 노화에서 MAPKinase 활성 억제에 의한, NF- κ B와 AP-1 활성 억제에 의해 MMP-1과 MMP-3 발현을 억제함으로써 자외선에 의한 피부노화 증상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

향후 본 연구를 바탕으로 사상자 추출물의 자외선에 의한 피부 노화 효과를 전임상과 임상적으로 입증하기 위한 후속 연구가 행해져야 하며, 이를 통해 사상자 추출물이 항 노화 제제 개발의 후보 물질이 될 수 있을 것이다.

결 론

본 연구를 통하여 사상자 추출물은 HDFs에서 UVB로 유도된 MMP-1과 MMP-3 발현을 유의하게 억제하였다. 그 기전으로는 MAPKinase의 인산화를 억제하고, 전사인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성을 억제하는 것으로 확인되었다. 이런 결과들은 사상자 추출물이 자외선에 의한 피부노화에서 예방물질 및 치료제의 후보 물질이 될 수 있는 실험적 근거로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2018학년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 수행되었습니다.

References

- Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: A review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2008;30:87-95.

2. Varani J, Perone P, Fligel SE, Fisher GJ, Voorhees JJ. Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. *J. Invest. Dermatol.* 2002;119:122-9.
3. Moon HJ, Lee SH, Ku MJ, Yu BC, Jeon MJ, Jeong SH, Stonik VA, Zvyagintseva TN, Ermakova SP, Lee YH. Fucoidan inhibits UVB-induced MMP-1 promoter expression and down regulation of type I procollagen synthesis in human skin fibroblasts. *Eur J Dermatol.* 2009;19(2):129-34.
4. Pittayapruerk P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6):E868.
5. Deorukhkar A, Krishnan S, Sethi G, Aggarwal BB. Back to basics: how natural products can provide the basis for new therapeutics. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2007;16(11):1753-73.
6. Cavinato M, Waltenberger B, Baraldo G, Grade CVC, Stuppner H, Jansen- Dürr P. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology.* 2017;18(4):499-516.
7. KOREAN TRADITIONAL KNOWLEDGE PORTAL: medicinal parts, efficacy, Disease & Symptom DB: Available from: <http://www.koreantk.com/ktkp2014/medicine/medicine-view.view?medCd=M0001679>, assessed 10/11/18
8. Kim GT, Kim SY, Kim YM. Torilis japonica extract fraction compound, EGFR-targeted inhibition of cancer abnormal metastasis in A549 lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2017;8(2):1206-1212.
9. Yun CY, Kim D, Lee WH, Park YM, Lee SH, Na M, Jahng Y, Hwang BY, Lee MK, Han SB, Kim Y. Torilin from *Torilis japonica* inhibits melanin production in alpha-melanocyte stimulating hormone-activated B16 melanoma cells. *Planta Med.* 2009;75 (14):1505-8.
10. Kim GT, Lee SH, Kim YM. Torilis japonica extract-generated intracellular ROS induces apoptosis by reducing the mitochondrial membrane potential via regulation of the AMPK-p38 MAPK signaling pathway in HCT116 colon cancer. *Int J Oncol.* 2016;49(3):1088-98.
11. Endale M, Kim TH, Kwak YS, Kim NM, Kim SH, Cho JY, Yun BS, Rhee MH. Torilin Inhibits Inflammation by Limiting TAK1-Mediated MAP Kinase and NF- κ B Activation. *Mediators Inflamm.* 2017;2017 Article ID 7250968: 1-13.
12. Kim YJ, Kim HN, Shin MS, Choi BT. Thread Embedding Acupuncture Inhibits Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Photoaging in Hairless Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015: 539172.
13. Ichihashi M, Ando H, Yoshida M, Niki Y, Matsui M. Photoaging of the skin. *Anti-Aging Med.* 2009;6:46-59.
14. Liu Y, Hwang E, Ngo HTT, Perumalsamy H, Kim YJ, Li L, Yi TH. Protective Effects of *Euphrasia officinalis* Extract against Ultraviolet B-Induced Photoaging in Normal Human Dermal Fibroblasts. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3327.
15. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996;379:335-9.
16. Chung JH, Seo JY, Lee MK, Eun HC, Lee JH, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Ultraviolet modulation of human macrophage metalloelastase in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2002;119:507-12.
17. Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2001;117:1218-24.
18. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002;138:1462-70.
19. Brenneisen P, Wenk J, Wlaschek M, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K. Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 2000;275:4336-44.
20. Kim JK, Mun S, Kim MS, Kim MB, Sa BK, Hwang JK. 5,7-Dimethoxy flavone, an activator of PPAR α / γ , inhibits UVB-induced MMP expression in human skin fibroblast cells. *Exp Dermatol* 2012;21:211-6.
21. Larbi A, Douziech N, Fortin C, Linteau A, Dupuis G, Fulop T Jr. The role of the MAPK pathway alterations in GM-CSF modulated human neutrophil apoptosis with aging. *Immun Ageing.* 2005;2(1):6.
22. Gharagozloo M, Jafari S, Esmaeil N, Javid EN, Bagherpour B, Rezaei A. Immunosuppressive effect of silymarin on mitogen-activated protein kinase signalling pathway: the impact on T cell proliferation and cytokine production. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2013;3(3):209-14.
23. Ham SA, Kang ES, Lee H, Hwang JS, Yoo T, Paek KS,

Park C, Kim JH, Lim DS, Seo HG. PPAR δ inhibits UVB-induced secretion of MMP-1 through MKP-7-mediated

suppression of JNK signaling. *J Invest Dermatol.* 2013;133(11):2593-600.