

## 해죽순(*Nipa fruticans* Wurmb) 추출물의 UVB 유도 DNA 손상 및 MMP 발현 억제 효과

한 소 연<sup>\*†</sup> · 장 태 원<sup>\*\*</sup> · 이 다 윤<sup>\*</sup> · 문 지 선<sup>\*\*\*</sup> · 김 용 신<sup>\*\*\*</sup> · 박 재 호<sup>\*\*\*\*,††</sup>

\*중원대학교 생명과학과, 석사대학원생

\*\*클리브랜드 클리닉 플로리다 연구 & 혁신센터, 박사후연구원

\*\*\*중원대학교 뷰티메디컬학과, 교수

\*\*\*\*중원대학교 식품제약학과, 교수

(2024년 7월 27일 접수, 2024년 9월 27일 수정, 2024년 9월 28일 채택)

## Effects of *Nipa fruticans* Wurmb Extract on Inhibition of UVB-Induced DNA Damage and MMP Expression

So Yeon Han<sup>1,†</sup>, Tae Won Jang<sup>2</sup>, Da Yoon Lee<sup>1</sup>, Ji-Sun Moon<sup>3</sup>, Yong-Shin Kim<sup>3</sup>, and Jae Ho Park<sup>4,††</sup>

<sup>1</sup>Jungwon University, Medicinal Plant Science, 85, Munmu-ro, Goesan-eup,  
Goesan-gun, Chungcheongbuk-do 28027, Korea

<sup>2</sup>Cleveland Clinic, Florida Research & Innovation center

<sup>3</sup>Jungwon University, Department of Beauty Medical

<sup>4</sup>Jungwon University, Department of Pharmaceutical Science

(Received July 27, 2024; Revised September 27, 2024; Accepted September 28, 2024)

**요약:** 인간의 피부는 물리적 요인, 화학적 요인으로부터 신체를 보호하는 기관이다. 피부는 신체 기관중 가장 크고 거대하며 표피, 진피, 및 피하조직으로 구성된다. 피부에 지속적인 자외선 노출은 DNA 손상, 단백질의 산화, 및 성인병을 유발하는 요인이 될 수 있다. *Nypa fruticans* Wurmb (NF)에는 풍부한 식물화학물질(폴리페놀 및 플라보노이드)이 포함되어 있기 때문에 전통적으로 호흡기 및 질환을 치료하는데 사용되어져 왔다. 본 연구에서는 UVB로 자극된 Hs68 세포에서 NF 에틸아세테이트 분획물(ENF)의 DNA damage 치유 및 주름 관련 인자 억제에 대한 효과를 조사했다. Westernblotting을 통해 DNA damage 관련 단백질 인자 및 주름 관련 단백질 인자의 발현을 확인했다. 또한, wound-healing 실험을 통해 ENF의 상처 회복 능력을 확인했다. ENF는 DNA damage 관련 단백질 인산화된 H2AX ( $\gamma$ -H2AX), checkpoint kinase 2 (Chk2), protein53 (p53), 및 인산화된 protein53 (p-p53)의 발현을 유의하게 억제했다. 뿐만아니라, ENF는 주름 관련 단백질 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), 및 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)의 발현도 억제했다. 고농도의 ENF 처리 시 Hs68 세포의 상처치유 효과도 확인되었다. 결론적으로, ENF는  $\gamma$ -H2AX, Chk2, p53, 및 p-p53의 발현을 유의하게 억제해서 DNA damage를 치유하고 MMP-1, MMP-3, 및 MMP-9의 발현을 억제 함으로써 주름 생성억제가능성이 있다고 생각된다. 이러한 결과는 ENF가 UVB로 자극된 Hs68에서  $\gamma$ -H2AX, Chk2, p53 및 MMP 경로를 조절하여 UVB로 인한 피부의 손상을 억제할 수 있는 천연자원으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

†주 저자 (e-mail: hansy9911@naver.com)  
call: 043-830-8614

†† 교신저자 (e-mail: parkjh@jwu.ac.kr)  
call: 043-830-8614

**Abstract:** The human skin is an organ that protects the body from physical and chemical factors. The skin is the largest and most massive of the body's organs and is composed of the epidermis, dermis, and subcutaneous tissue. Constant UV exposure to the skin can cause DNA damage, oxidation of proteins, and contribute to adult diseases. *Nyssa fruticans* Wurm (NF), rich in phytochemicals (polyphenols and flavonoids), has been traditionally used for treating respiratory and other diseases. This study investigated the effects of NF ethyl acetate fraction (ENF) on DNA damage healing and inhibition of wrinkle-related factors in UVB-stimulated Hs68 cells. Western blotting was used to assess the expression of DNA damage-related proteins and wrinkle-related protein factors. In addition, the wound recovery capability of ENF was confirmed through wound-healing experiments. ENF significantly suppressed the expression of DNA damage-related proteins Phosphorylated H2AX ( $\gamma$ -H2AX), checkpoint kinase 2 (Chk2), protein53 (p53), and Phosphorylated protein53 (p-p53). Furthermore, ENF inhibited the expression of wrinkle-related proteins matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). High concentrations of ENF also enhanced wound healing in Hs68 cells. ENF is thought to have the potential to heal DNA damage by significantly suppressing the expression of  $\gamma$ -H2AX, Chk2, p53, and p-p53, as well as to inhibit wrinkle formation by suppressing the expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-9. These results suggest that ENF can be used as a natural resource to suppress skin damage caused by UVB by regulating the  $\gamma$ -H2AX, Chk2, p53, and MMP pathways in Hs68 cells induced by UVB.

**Keywords:** reactive oxygen species, DNA damage, anti-wrinkle,  $\gamma$ -H2AX, MMP

## 1. 서 론

피부는 다양한 외부 요인(환경오염 물질, 흡연, 알코올 섭취 및 UV)에 의해 노화할 수 있다[1]. 특히 자외선 B (UVB)는 280 ~ 320 nm의 파장대로 표피를 관통하여 피부에 광노화를 유발하는 주된 요인이다[2,3]. 장시간의 자외선 조사는 피부 손상 이외에도 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성과 직접적인 DNA 손상을 유발한다고 알려져 있다[4-7].

Checkpoint kinase 2 (Chk2), 인산화 된 protein53 (p-p53), 및 인산화 된 H2AX ( $\gamma$ -H2AX)는 DNA 손상에 중요한 역할을 한다 [8]. 이들의 발현은 DNA 손상 후 복구에 관여하며[9,10], protein53 (p53)은 세포의 ROS 수준을 조절하여 종양 억제제를 유도하는데 중요한 역할을 한다[11]. 과도한 ROS의 생성은 p53의 인산화를 진행 시켜서 노화를 일으킨다[12]. ROS 증가와 DNA 손상은 주름, 피부 구조 변형을 유발할 수 있다[13,14].

피부구조를 유지하는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)은 다양한 단백질 (프로테오글리칸, 콜라겐, 및 엘라스틴)로 구성되어 있다[15,16]. ECM은 matrix metalloproteinase (MMP)에 의하여 분해 될 수 있다[17]. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), 및 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)의 증가는 ECM을 구성하는 콜라겐의 분해를 유발하여 피부 손상을 악화시킨다[18]. 그러므로 광노화로 인한 콜라겐의 분해를 방지하는 것은 피

부 세포 복구에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다[19]. 따라서 ROS의 제거는 생물학적인 다양한 질병을 예방하기 위해 필요한 과정이다[8]. 해죽순(*Nyssa fruticans* Wurm, *N. fruticans*)은 Araceae과에 속하는 식물로 전통적으로 천식, 결핵, 인후통, 및 간질환에 사용되어 왔으며[17,20,21], 잎과 줄기의 메탄올 추출물이 진통효과 및 당뇨병 예방에 효과적인 것으로 연구되었다[22]. 또한 본 연구진의 이전 연구에서 해죽순(*N. fruticans*)의 ethyl acetate 분획물(ENF)의 항산화와 항염증 및 미백 효과를 확인하였다[23,24].

따라서 본 연구에서는 피부세포 모델에서 UVB 조사에 따른 ENF의 DNA 손상 회복과 관련된 인자인 Chk2, p53,  $\gamma$ -H2AX 및 주름과 관련된 인자인 MMP의 개선 효과를 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 해죽순 추출물

본 연구에서 사용된 ENF는 이전 연구를 통해 얻어진 추출물을 동일하게 사용하였다[24]. 해죽순(*N. fruticans*, NF) 484.0 g을 80% methanol 4.2 L로 7 일 동안 침지 추출했다. 추출물과 분획은 진공 증발기(N-1110S, EYELA, Japan)를 사용하여 농축했다. 수용성 잔류물은 petroleum ether와 ethyl acetate로 분획했다. 분획 된 샘플(ENF, 36.8g)은 사용할 때까지 4 °C에서 냉장 보관했다. 실험에 사용된 ENF는 DMSO (0.1%를 초과하지 않음)에 50 mg/mL의 농도로 용해했다.

## 2.2. 세포 배양 및 세포 독성

본 연구에서 사용된 인간 섬유아세포주인 Hs68 (human skin fibroblast)은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로 부터 분양 받아서 사용 되었다. Hs68 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Biowest, France), 1% penicillin/streptomycin (Biowest, France) 및 plasmocin prophylactic (InvivoGen, USA)이 포함된 DMEM에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양 되었다. 추출물의 세포에 대한 독성을 평가하기 위해서 1 × 10<sup>5</sup> cells/well 만큼 96 well plate에 세포를 24 h 동안 배양하였다. 이후 Hs68 세포는 12.5, 25, 50, 100, 200, 및 400 µg/mL 농도의 추출물로 처리된 뒤 24 h 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양되었다. 24 h 후 Cell-Titer 96® AQueous One Solution (Promega, USA)를 이용하여 microplate reader (Epoch 2, Bio Tek, USA) 490 nm에서 흡광도를 측정한 다음 무처리군과 비교하여 세포 독성을 평가하였다.

## 2.3. UVB 자극에 의한 세포 생존력 평가

UVB 조사에 대한 세포독성을 평가하기 위해서 Hs68 세포를 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/well 만큼 60 mm cell culture dish에 세포를 24 h 동안 배양하였다. 다양한 강도의 UVB 처리를 위해 UV Cross linker (XL-1000, Artisan Technology Group, USA)를 이용하여 UVB를 40, 60, 80, 100, 및 200 mJ/cm<sup>2</sup>로 조사하였다. 이후 세포 생존률을 확인하기 위해 trypan blue dye 0.4% solution (Bio-Rad, USA)을 사용해서 세포를 염색한 뒤 automated cell counter (TC20™, Bio-Rad, USA)로 세포 생존률을 확인하였다.

## 2.4. Western Blot

Hs68세포를 60 mm cell culture dish에 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/well 만큼 24 h 동안 배양하였다. 세포는 100 및 200 µg/mL 농도의 ENF로 2 h 동안 처리되었다. 이후 UVB에 의한 자극을 주기 위해 40 mJ/cm<sup>2</sup> 강도의 UVB를 처리하였다. 0.5M EDTA, protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, USA)이 포함된 RIPA 완충액(Biosesang, Korea)을 사용해서 세포를 용해 시켰다. 세포 용해물을 4 °C, 16,000 x g 에서 15 min 동안 원심 분리(1730R, LaboGene, Denmark)하였다. 세포 용해물의 단백질 함량은 제조업체의 프로토콜에 따라 Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 정량화하였다. 단백질은 SDS-PAGE를 사용해서 분리한 뒤 Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF)에 transfer하였다. 0.1% Tween 20 (Bio

Sesang, Korea)이 포함된 Tris buffer에 5.0% Bovine Serum Albumin (BSA, Bio Sesang, Korea)를 사용하여 blocking 하였다. 1 차 항체를 3.0% BSA에 1 : 1,000 희석하고 4 °C에서 12 h 이상 배양하였다. 이후 HRP가 접합된 2 차 항체와 함께 1 h 동안 배양한 뒤 enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 검출하고 Chemi Doc (ChemiDoc Imaging Systems, Bio-Rad, USA)으로 시각화 하였다.

## 2.5. Wound Healing Assay

Hs68 세포를 6 well plate에 3 × 10<sup>5</sup> cells/well 만큼 24 h 동안 배양하였다. 세포는 멸균된 10 µL pipette tip으로 긁어서 인공적으로 상처를 만들었다. 이후 24 h 동안 ENF 100 및 200 µg/mL 농도를 처리하였다. 상처를 만든 0 h 과 24 h에 현미경 (CKX53, Olympus, Japan)을 사용해서 상처 치유 과정을 관찰 후 DSLR 카메라 (DS126271, Canon, Japan)로 이미지를 얻었다.

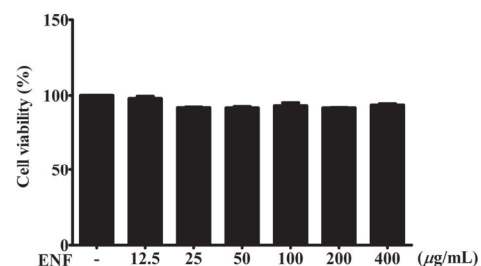
## 2.6. 통계학적 분석

모든 실험은 3 번 이상 반복 수행되었다. 모든 데이터는 통계 프로그램(GraphPad Prism 5.02, GraphPad Software, USA)을 사용해서 분석되었다. 각각의 데이터는 일원분석법을 사용해서 분석되었으며, Dunnett 사후 검정을 통해서 실험의 유의성을 검증하였다. *p* < 0.05 수준은 통계적으로 유의미한 결과로 간주하였다.

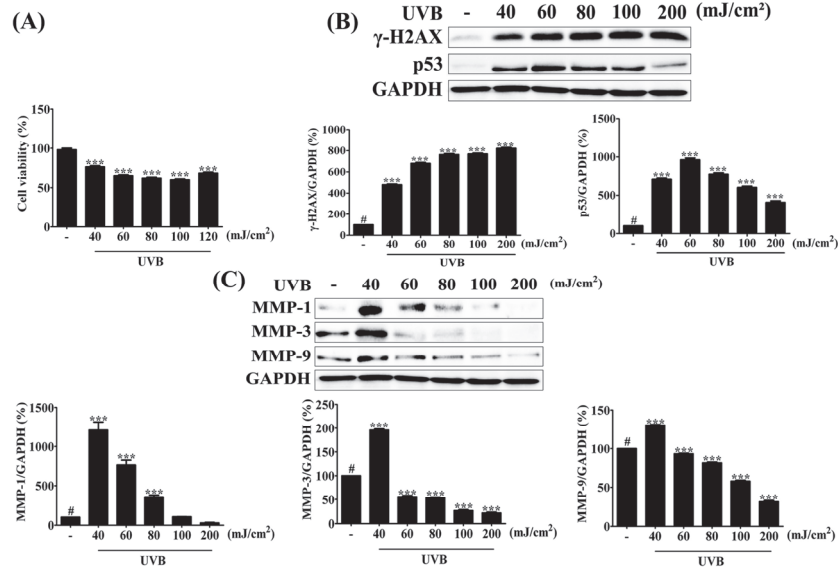
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 세포 독성

ENF의 세포독성을 확인하기 위해서 다양한 농도(12.5, 25, 50, 100, 200, 및 400 µg/mL)의 ENF를 Hs68에



**Figure 1.** Effect of ENF on Hs68 cell viability. ENF; ethyl acetate fraction of *N. fruticans* Wurmb. All data are presented as mean ± SD for N ≥ 3.



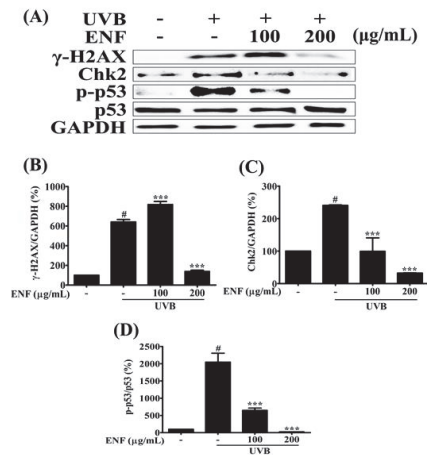
**Figure 2.** Effects of UVB irradiation on Hs68 cells. (A) Effect of UVB on the cell viability of Hs68. (B) Effect of UVB irradiation intensity on  $\gamma$ -H2AX and p53. (C) Effect of UVB irradiation intensity on MMP-1, MMP-3, and MMP-9. All data are presented as mean  $\pm$  SD for  $N \geq 3$  (# value relative to the control;  $p < 0.001$  vs. untreated group and  $p < 0.001$  vs. UVB stimulated group). UVB; ultraviolet B,  $\gamma$ -H2AX; Phosphorylated H2AX, Chk2; Checkpoint kinase 2, p53; protein53, GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, MMP-1; matrix metalloproteinase-1, MMP-3; matrix metalloproteinase-3, MMP-9; matrix metalloproteinase-9.

처리한 뒤, MTS 시약을 사용해서 세포독성을 평가하였고, ENF는 모든 농도에서 유의적으로 독성이 확인되지 않았다 (Figure 1).

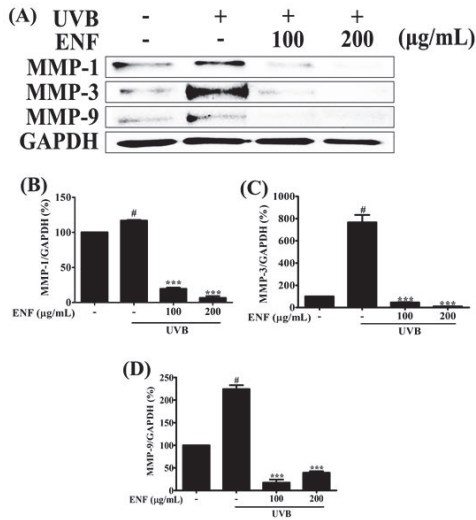
UVB 조사 조건을 확인하기 위해 다양한 강도 (40, 60, 80, 100, 및 120  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )의 UVB를 조사한 다음 조사 강도 별 세포독성(Figure 2A),  $\gamma$ -H2AX, p53 (Figure 2B), MMP-1, MMP-3, 및MMP-9 (Figure 2C)의 발현을 확인하였다. 세포 독성은 40, 60, 80, 100, 및 120  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ 의 모든 강도에서 대조군에 비해 유의성이 있게 나타났다. 이후 진행된 시험에서는 모든 결과에서 대조군에 비해 유의성을 보인 40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  강도의 UVB를 처리하였다. p53은 다양한 종류의 세포 스트레스(저산소증, 산화적 스트레스, 및 DNA damage)에 의하여 발현이 증가 되는 것으로 알려져 있다[25].

3.2. ENF가 DNA Damage 회복에 미치는 영향

UVB로 인한 DNA damage 회복에 ENF가 미치는 영향을 확인하기 위해서 western blotting 방법을 사용해서 Hs68 세포의  $\gamma$ -H2AX, Chk2, p53, 및 p-p53의 발현을 확인하였다 (Figure 3). UVB 처리는 대조군(1.00 배)에 비해 DNA



**Figure 3.** Inhibitory effect of ENF on UVB induced DNA damage markers:  $\gamma$ -H2AX, Chk2, p-p53, and p53 on Hs68 cells. (A) Expression of  $\gamma$ -H2AX, Chk2, p-p53, and p53 based on UVB irradiation. (B) Bar graph of the expression of  $\gamma$ -H2AX based on UVB irradiation. (C) Bar graph of the expression of Chk2 based on UVB irradiation. (D) Bar graph of the expression of p-p53 based on UVB irradiation. All data are presented as mean  $\pm$  SD for  $N \geq 3$  (# value relative to the UVB irradiation condition;  $\#p < 0.001$  vs. untreated group and  $***p < 0.001$  vs. UVB stimulated group). p-p53; Phosphorylated protein53

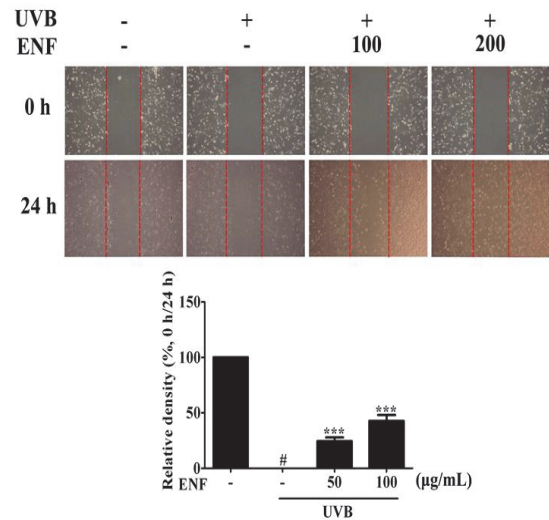


**Figure 4.** Inhibitory effect of ENF on anti-wrinkle on by UVB stimulation MMP-1, MMP-3, and MMP-9 on Hs68 cells. (A) Expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 based on UVB irradiation. (B) Bar graph of the expression of MMP-1 based on UVB irradiation. (C) Bar graph of the expression of MMP-3 based on UVB irradiation. (D) Bar graph of the expression of MMP-9 based on UVB irradiation. All data are presented as mean ± SD for N ≥ 3 (# value relative to the UVB irradiation condition; # *p* < 0.001 vs. untreated group and \*\*\* *p* < 0.001 vs. UVB stimulated group).

damage 관련 단백질 인자  $\gamma$ -H2AX (6.40 배), Chk2 (2.41 배), 및 p-p53 (20.45 배)의 발현을 증가시켰다.  $\gamma$ -H2AX, Chk2, 및 p-p53의 발현은 세포의 DNA damage를 의미한다 [26,27]. ENF의 처리(100 및 200  $\mu$ g/mL)는  $\gamma$ -H2AX (8.18 및 1.38 배), Chk2 (0.32 및 0.99 배), 및 p-p53 (6.46 및 0.22 배)의 발현이 양성 대조군에 비해 현저히 감소한 것이 확인되었다.

### 3.3. ENF의 광노화 개선 효과

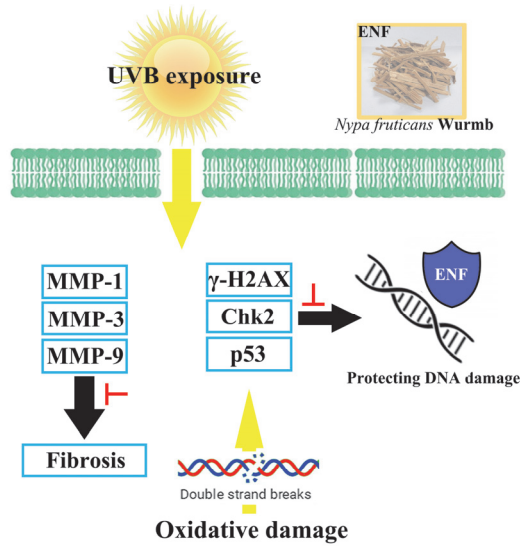
UVB로 인한 광노화 지표와 관련된 단백질 인자들의 발현을 확인하기 위하여 Hs68 세포의 MMP-1, MMP-3, 및 MMP-9의 발현을 확인하였다(Figure 4). UVB 처리는 대조군 (1.00 배)에 비해 MMP-1, MMP-3, 및 MMP-9의 발현을 증가시켰다. MMP의 발현은 광노화와 관련 지표로 알려져 있다[28]. ENF의 처리 (100 및 200  $\mu$ g/mL)는 MMP-1 (0.20 및 0.07), MMP-3 (0.46 및 0.11), 및 MMP-9 (0.18 및 0.39)의 발현이 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소한다



**Figure 5.** Wound healing effect of ENF on Hs68 cells. All data are presented as mean ± SD for N ≥ 3 (# value relative to the UVB irradiation condition; # *p* < 0.001 vs. untreated group and \*\*\* *p* < 0.001 vs. UVB stimulated group).

는 것을 확인하였다. ENF의 치유 효과를 확인하기 위해서 wound healing assay를 수행하였다. Wound healing assay는 자극으로 인해 손상된 조직의 기능을 다시 복구하는 과정을 확인하는 방법으로 알려져 있다[29]. ENF의 처리는 대조군(1.00 배)에 비해 50 및 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 손상된 면적에 비하여 0.23 배 및 0.45 배의 세포 손상이 회복된 것이 확인되었다(Figure 5). 이는 ENF가 UVB로 인해 손상된 Hs68 세포 손상 및 기능을 회복시킬 수 있을 것이라고 생각된다.

ENF는 UVB에 의해 상향 발현된  $\gamma$ -H2AX, Chk2, 및 p-p53의 발현을 유의적으로 감소시켰다.  $\gamma$ -H2AX는 DNA 손상 반응(DDR)에서 중요한 단백질 인자로,  $\gamma$ -H2AX의 감소는 DNA 복구의 지표라고 할 수 있다[30,31]. Chk2, 및 p53 경로는 DDR에서 p53과 연관된 세포 사멸 경로 활성화 및 세포주기 정지를 유도한다고 알려져 있다[32]. Chk2, 및 p53 경로의 발현 감소는 산화 스트레스의 억제를 나타낸다[26,33]. ENF는 UVB에 의해서 과도하게 발현된 MMP-1, MMP-3, 및 MMP-9의 발현도 감소시켰다. MMP의 억제는 인간의 피부노화를 방지한다고 알려져 있다[33]. 또한, 고농도의 ENF (200  $\mu$ g/mL)에서 손상된 세포의 치유가 가장 유의적으로 나타났다.



**Figure 6.** Effects of ENF on DNA damage and anti-wrinkle.

#### 4. 결 론

종합적으로 ENF는 UVB로 자극된 Hs68 세포의  $\gamma$ -H2AX, Chk2, p-p53, MMP-1, MMP-3, 및 MMP-9의 발현을 효과적으로 저해시켰다. 이러한 결과는 ENF가 손상된 Hs68 세포에서 DNA damage 및 항주름 보호와 세포 손상 및 기능 회복에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 생각된다(Figure 6). 하지만 본 연구에서 사용된 ENF는 해죽순의 ethyl acetate 분획물이므로, 임상에 적용하기 위해서는 이러한 결과를 바탕으로 후속 연구가 필요하다. 추가적인 연구를 통해 해죽순 천연물이 기능성 화장품과 식품의 소재로 학문적 및 산업적으로 활용될 가능성이 있다고 생각된다.

#### Acknowledgement

본 과제(결과물)는 2024년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역 혁신 사업의 결과입니다(2021RIS-001).

#### References

- R. I. Amer, S. M. Ezzat, N. M. Aborehab, M. F. Ragab, D. Mohamed, A. Hashad, D. Attia, M. M. salama, and M. H. El Bishbishy, Downregulation of MMP1 expression mediates the anti-aging activity of *Citrus sinensis* peel extract nanoformulation in UV induced photoaging in mice, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **138**, 111537 (2021).
- H. S. Lee, M. S. Jeong, S. C. Ko, S. Y. Heo, H. W. Kang, S. W. Kim, C. W. Hwang, K. D. Lee, C. Oak, M. J. Jung, J. Oh, W. S. Park, Il. W. Choi, and W. K. Jung, Fabrication and biological activity of polycaprolactone/ phlorotannin endotracheal tube to prevent tracheal stenosis: An *in vitro* and *in vivo* study, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **108**(3), 1046 (2020).
- M. Gong, X. Zhai, L. Yu, C. Li, X. Ma, Q. Shen, Y. Han, and D. Yang, ADSCs inhibit photoaging and photocarcinogenesis-related inflammatory responses and extracellular matrix degradation, *J. Cell. Biochem.*, **121**(2), 1205 (2020).
- P. Morliere, A. Moysan, and I. Tirache, Action spectrum for UV-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts, *Free Radic. Biol. Med.*, **19**(3), 365 (1995).
- M. Ichihashi, M. Ueda, A. Budiyo, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru, and T. Horikawa, UV-induced skin damage, *Toxicology*, **189**(1-2), 21 (2003).
- D. R. Bickers and M. Athar, Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease, *J. Investig. Dermatol.*, **126**(12), 2565 (2006).
- E. C. Naylor, R. E. B. Watson, and M. J. Sherratt, Molecular aspects of skin ageing, *Maturitas*, **69**(3), 249 (2011).
- N. Y. Jang, Ph. D. Dissertation, Pukyong National Univ., Busan, Korea (2014).
- T. T. Paull, E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, and W. M. Bonner, A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage, *Curr. Biol.*, **10**(15), 886(2000).
- S. Zhou, A. Zhao, Y. Wu, T. Bao, Y. Mi, and C. Zhang, Protective effect of follicle-stimulating hormone on DNA damage of chicken follicular granulosa cells by inhibiting CHK2/p53, *Cells*, **11**(8), 1291 (2022).
- B. Liu, Y. Chen, and D. K. S. Clair, ROS and p53: a versatile partnership, *Free. Radic. Biol. Med.*, **44**(8), 1529 (2008).
- I. Ben-Porath and R. A. Weinberg, The signals and

- pathways activating cellular senescence, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **37**(5), 961 (2005).
13. T. Quan, T. He, S. Kang, J. J. Voorhees, and G. J. Fisher, Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor- $\beta$  type II receptor/Smad signaling, *Am. J. Pathol.*, **165**(3), 741 (2004).
  14. H. S. Talwar, C. E. M. Griffiths, G. J. Fisher, T. A. Hamilton, and J. J. Voorhees, Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **105**(2), 285 (1995).
  15. J. S. Bang and S. Y. Choung, Inhibitory effect of oyster hydrolysate on wrinkle formation against UVB irradiation in human dermal fibroblast via MAPK/AP-1 and TGF $\beta$ /Smad pathway, *J. Photochem. Photobiol. B*, **209**, 111946 (2020).
  16. A. V. Benedetto, The environment and skin aging, *Clin. Dermatol.*, **16**(1), 129 (1998).
  17. I. D. Kim, R. H. Kwon, Y. Y. Heo, H. J. Kang, and B. J. Ha, Supercritical extraction of oriental herb: Anti-aging and anti-wrinkle effects, *Korean. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, **23**(6), 529 (2008).
  18. N. Yoshizaki, T. Fujii, R. Hashizume, and H. Masaki, A polymethoxyflavone mixture, extracted from orange peels, suppresses the UVB-induced expression of MMP-1, *Exp. Dermatol.*, **25**, 52 (2016).
  19. Z. Liu, Y. Li, H. Song, J. He, G. Li, Y. Zheng, and B. Li, Collagen peptides promote photoaging skin cell repair by activating the TGF- $\beta$ /Smad pathway and depressing collagen degradation, *Food. Funct.*, **10**(9), 6121 (2019).
  20. P. Tamunaidu and S. Saka, Chemical characterization of various parts of nipa palm (*Nypa fruticans*), *Ind. Crops. Prod.*, **34**(3), 1423 (2011).
  21. M. al-Mamun, N. Jahan, M. H. Chowdhury, R. Jahan, and D. Nasrin, Brine shrimp toxicity study of different Bangladeshi medicinal plants, *Adv. Nat. Appl. Sci.*, **4**(2), 163 (2010).
  22. H. Reza, W. M. Haq, A. K. Das, S. Rahman, R. Jahan, and M. Rahmatullah, Anti-hyperglycemic and antinociceptive activity of methanol leaf and stem extract of *Nypa fruticans* Wurmb, *Pak. J. Pharm. Sci.*, **24**(4), 4853 (2011).
  23. H. J. Park, T. W. Jang, S. Y. Han, S. S. Oh, J. B. Lee, S. M. Myoung, and J. H. Park, Anti inflammatory effects of *Nypa fruticans* Wurmb via NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in macrophages, *Exp. Ther. Med.*, **24**(6), 1 (2022).
  24. S. Y. Han, T. W. Jang, H. J. Park, S. S. Oh, J. B. Lee, S. M. Myoung, and J. H. Park, *Nypa fruticans* Wurmb inhibits melanogenesis in isobutylmethylxanthine-treated melanoma via the PI3K/AKT/mTOR/CREB and MAPK signaling pathways, *Exp. Ther. Med.*, **24**(6), 1 (2022).
  25. T. Ozaki and A. Nakagawara, Role of p53 in cell death and human cancers, *Cancers*, **3**(1), 994 (2011).
  26. T. W. Jang, J. S. Choi, and J. H. Park, Protective and inhibitory effects of acteoside from *Abeliophyllum distichum* Nakai against oxidative DNA damage, *Mol. Med. Rep.*, **22**(3), 2076 (2020).
  27. P. Chaturvedi, W. K. Eng, Y. Zhu, M. R. Mattern, R. Mishra, M. R. Hurle, X. Zhang, R. S. Annan, Q. Lu, L. F. Faucette, G. F. Scott, X. Li, S. A. Carr, R. K. Johnson, J. D. Winkler, and B-B. S. Zhou, Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway, *Oncogene*, **18**(28), 4047 (1999).
  28. J. H. Han, J. S. Bang, Y. J. Choi, and S. Y. Choung, Oral administration of oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates protects against wrinkle formation by regulating the MAPK pathway in UVB-irradiated hairless mice, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **18**, 1436 (2019).
  29. B. Enyedi and P. Niethammer, Mechanisms of epithelial wound detection, *Trends. Cell. Biol.*, **25**(7), 398 (2015).
  30. W. M. Bonner, C. E. Redon, J. S. Dickey, A. J. Nakamura, O. A. Sedelnikova, S. Solier, and Y. Pommier,  $\gamma$ H2AX and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **8**(12), 957 (2008).
  31. A. Kinner, W. Wu, C. Staudt, and G. Iliakis,  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin, *Nucleic. Acids. Res.*, **36**(17), 5678 (2008).
  32. Y. Shi, E. Felley-Bosco, T. M. Marti, K. Orlowski, M. Pruschy, and R. A. Stahel, Starvation-induced activation of ATM/Chk2/p53 signaling sensitizes cancer cells to cisplatin, *BMC. Cancer*, **12**, 1 (2012).

33. Y. P. Hwang, J. H. Choi, H. J. Yun, E. H. Han, H. G. Kim, J. Y. Kim, B. H. Park, T. Khanal, J. M. Choi, Y. C. Chung, and H. G. Jeong, Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression, *Food. Chem. Toxicol.*, **49**(1), 93 (2011).