

## 인체 피부 세포주 (HaCaT)에서 Kaempferol, Quercetin의 Hyaluronan 합성 촉진 효과에 대한 연구

김 승 훈<sup>†</sup> · 남 개 원 · 강 병 영\* · 이 해 광 · 문 성 준 · 장 이 섭

태평양기술연구원 피부과학연구소, \*태평양기술연구원 화장품 연구소  
(2005년 2월 28일 접수, 2005년 3월 5일 채택)

### The Effect of Kaempferol, Quercetin on Hyaluronan-Synthesis Stimulation in Human Keratinocytes (HaCaT)

Seung Hun Kim<sup>†</sup>, Gae Won Nam, Byung Young Kang\*, Hae Kwang Lee,  
Seong Joon Moon, and Ih Seop Chang

Skin Research Institute, Amore Pacific R&D Center, 314-1, Bora-ri, Giheung-eup, Yongin-si, Gyeonggi-do 449-729, Korea  
\*Cosmetic Research Institute, Amore Pacific R&D Center  
(Received February 28, 2005; Accepted March 5, 2005)

**요 약:** 수분 보유력이 우수한 hyaluronan (HA)은 피부 보습에 관여하는 여러 물질들 중 하나로 피부의 extracellular matrix를 구성하는 주요 성분 중 하나이다. Glycosaminoglycans (GAGs)의 구성 성분의 하나로 과거에는 진피에서 유래하는 것으로 알려져 왔으나 최근 연구들을 통해 표피에서 합성되는 것이 확인되었다. Polyphenolic compound의 일종인 kaempferol과 quercetin은 채소류 같은 식물성 음식에 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며, kaempferol은 인체 표피세포에서 glutathione 합성을 증가시키고 quercetin은 lipoxygenase inhibitor로 PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) - mediated 표피세포 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 우리는 표피 세포주에서 이들 flavonoids - kaempferol, quercetin - 의 HA 합성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 물질 처리에 따른 HA 합성 효소인 hyaluronan synthase 1, 2, 3 (HAS1, 2, 3) 유전자 발현의 변화를 semi-quantitative RT-PCR을 통해 살펴보았다. 이들 flavonoid들에 의해 24 h 후 HAS2, 3 mRNA 발현이 증가되는 것을 발견하였다. 또한 HA 합성량의 변화를 알아보기 위해 ELISA를 수행하였다. 24 h 물질 처리 후 배지를 수거하여 HA 합성량을 살펴본 결과 이들 물질에 의해 합성이 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 비록 합성 촉진에서의 효과가 retinoic acid에는 못 미치지만 kaempferol과 quercetin은 표피 세포주에서 농도 의존적으로 HA 합성을 증가시켰다. 위의 결과를 통해 flavonoid류인 kaempferol과 quercetin이 피부에서 HA 생산을 촉진시킴을 알 수 있었고 이를 통해 피부 보습과 잔주름 개선에 효과를 볼 수 있을 것으로 생각된다.

**Abstract:** One of the key molecules involved in skin moisture is hyaluronan (hyaluronic acid, HA) with its associated water of hydration. The predominant component of the ECM (extracellular matrix) of skin is HA. It is the primordial and the simplest of the GAGs (glycosaminoglycans), a water-sorbed macromolecule in extracellular matrix, included between the vital cells of epidermis. In the skin, HA was previously thought to derive exclusively from dermis. But, recent studies revealed that HA could be synthesized in epidermis. Flavonoids are polyphenolic compounds that is found mainly in foods of plant origin. Kaempferol was known to increase glutathione synthesis in human keratinocyte. And quercetin blocked PPAR-mediated keratinocyte differentiation as lipoxygenase inhibitors. In this study, we sought to evaluate the effect of flavonoid, kaempferol and quercetin on production HA in keratinocyte. We examined the changes of three human hyaluronan synthase genes (HAS1, HAS2, HAS3) expression by semi-quantitative RT-PCR when kaempferol or quercetin was added to cultured human keratinocytes. We found that these flavonoids slightly upregulated HAS2, HAS3 mRNA after 24 h. And we investigated the effect on HA production by ELISA. When we evaluated the level of HA in culture medium after 24 h incubation. We found enhanced accumulation of HA in the culture medium. Although the effects of above flavonoids are less than retinoic acid, the data indicate that kaempferol, quercetin can dose-dependently increase the level of HA in epidermis cell line. It suggested that flavonoid, kaempferol, and quercetin increased production of HA in skin and it helped to elevate skin moisture and improve facial wrinkle.

**Keywords:** epidermis, hyaluronan, HA, flavonoid, kaempferol, quercetin

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: shkim1228@amorepacific.com)

## 1. 서 론

Hyaluronan (HA)은 N-acetyl-D-glucosamine과 D-glucuronic acid로 구성된 disaccharide 반복 단위의 중합체로 그 길이는 조직에 따라 다양하지만 일반적으로 100에서 20,000 disaccharide 단위로 되어 있다. 세포 외 기질의 주요 구성성분으로, 수분 보유, 세포간 간격 유지, 세포 성장인자 및 영양성분의 저장 및 확산에 관여할 뿐만 아니라, 세포의 분열과 분화, 이동 등에도 관여하는 것으로 보고된 바 있다.

포유류의 체내에 존재하는 HA의 50% 이상이 피부, 특히 표피의 세포간 간격과 진피의 결합 조직에 분포한다고 보고되었고, 이러한 HA는 주로 표피 각질 형성 세포와 진피 섬유아세포에 의해 합성되는 것으로 알려졌다. 인체 피부에서의 HA양은 노화와 함께 감소되는 것으로 보고되었는데, 피부에서의 HA 양의 감소는 노화에 따른 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나라고 여겨지고 있다[1-3].

피부 세포 배양 상태에서의 HA의 합성은 여러 종류의 성장인자와 trans-retinoic acid, N-methyl-L-serine 등에 의해 증가된다는 보고[4-9]와 피부에 도포된 여성호르몬 (estradiol) 및 그 유사물질이 HA의 합성을 증가시킨다는 보고[10-12]가 있으나, HA 대사에 대한 자세한 기작은 아직까지 밝혀지지 않았다. 단지, HA의 합성은 세포막의 안쪽 표면에서 HA 합성효소(hyaluronic acid synthase, HAS)에 의해 진행되며, 합성되는 동안 세포막을 뚫고 나와 세포 외 기질에 축적되는 것으로 알려졌다[13].

포유동물에서 HA 합성효소의 유전자는 서열상의 유사성이 높은 hyaluronic acid synthase1 (HAS1), hyaluronic acid synthase2 (HAS2), hyaluronic acid synthase3 (HAS3)의 세 가지 형태가 보고되었다. 이와 관련하여, 표피성장인자(Epidermal growth factor, EGF)를 표피세포 배양액 속에 첨가하였을 때 HA 합성 효소(HAS) 유전자 발현이 증가되었음이 보고된 바 있다[14]. 그러나, HA의 세포 및 조직에서의 분포, HA와 관련된 각종 인자 및 효소, 예를 들면 HA 합성효소(HAS) 또는 HA 활성을 조절하는 인자에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 HA을 보다 효과적으로 인체에 공급할 수 있는 방법에 대하여 꾸준히 연구한 결과, 항암 효과, 항산화 효과 및 항염, 항알레르기 효과 등이 있는 것으로 알려진 flavonoid류인 kaempferol과 quercetin이 상기의 효능 뿐만 아니라, 인체 세포 내의 HA 합성효소 유전자의 발현을 증가시켜 결과적으로 인체 내의 HA의 생성을 촉진하는 효능이 있음을 발견하였다. 즉, kaempferol과 quercetin을 인체 표피 피부 세포주에 처리할 경우, 세포에 의한 HA의 생성이 촉진되고 생체 내의 HA의 양이 증가하

므로, HA의 유용성을 이용하는 각종의 용도, 예를 들면 피부 탄력 증진, 피부 건조 방지 또는 피부 노화 방지와 같은 피부 개선 또는 예방 등의 부분에 이용할 수 있을 것으로 생각되어진다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기기

실험에 사용된 시약으로 kaempferol, quercetin, retinoic acid, phosphate buffered saline (PBS), sodium bicarbonate 등은 Sigma (USA)사 제품을 사용하였고, trypsin/EDTA, penicillin/streptomycin, Dulbeccos Modification of Eagles medium (DMEM), Trizol 등은 Gibco (USA) 사 제품을, FBS는 Hyclone사(USA) 제품을, RT-PCR kit는 MBI Fermentas사(Lithuania)의 First Strand cDNA Synthesis kit를, PCR은 Takara사(Japan)의 Ex Taq kit를, primer는 bioneer사(Republic of Korea) 제품을, ELISA를 위해 Echelon사(USA)의 HA-ELISA Kit 등을 사용하였다.

기기는 ELISA reader, Perkin-Elmer Cycler 9600, agarose gel electrophoresis system 등을 사용하였다.

ELISA를 수행하기 위해 Echelon사의 Hyaluronan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (HA-ELISA, Product No: K-1200)을 구입하였다.

### 2.2. 세포 배양 및 물질 처리

본 연구에 사용한 HaCaT 세포주는 독일 암연구소(DKFZ)의 Norbert E. Fusenig 박사로부터 분양 받았다. HaCaT 세포를 10% FBS (Hyclone 사), sodium bicarbonate 3.5 g/L 및 penicillin/streptomycin 100 IU/L을 함유하는 DMEM 배지에서 적절한 배양 조건(37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 하에서 배양하였다. 세포는 3일에 한번씩 신선한 배지로 교체해 주고 밀도가 최상에 도달하자마자 1:5의 분할 비로 2차 배양하였다. 물질을 처리하기 72 h 전에 조직 배양 플라스크 75 cm<sup>2</sup>당 1 × 10<sup>5</sup>개의 세포를 분주하여, 10% FBS를 함유하는 배지에서 48 h 동안 배양하였다. 그 후 FBS가 없는 배지에서 24 h 동안 배양하고, kaempferol과 quercetin, retinoic acid를 각각 × 1000의 농도로 DMSO에 녹여 stock으로 만든 후 final 농도가 0.1 μM, 1 μM, 10 μM가 되도록 처리하여 24 h 동안 배양하였다.

### 2.3. RNA Prep 및 RT-PCR

HaCaT 세포는 PBS로 두 번 세척하였고 RNA는 Trizol 시약을 사용하여 분리하였다. RNA 양은 spectrophotometer를 이용하여 측정하였고, 질은 agarose gel electro-

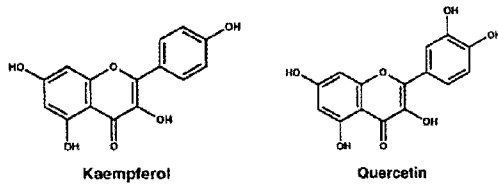


Figure 1. Structures of kaempferol and quercetin.

phoresis로 체크하였다.

정량한 RNA를 역전사하고, 이어 세 종류의 HA 합성 효소 HAS1, 2, 3에 특이적인 primer를 이용하여 각각의 정량적인 PCR을 수행하였다. 총 RNA 4 µg을 M-MuLV 역전사 중합효소(20 U/µL) 1 µL, RNase 억제제(20 U/µL) 1 µL, 5xReaction Buffer 4 µL, 10 mM dNTP mix 2 µL, oligo (dT) 프라이머(0.5 µg/µL) 1 µL를 함유하는 반응 혼합물 2 µL에서 역전사 하였다. 처음 RNA와 oligo (dT) primer와 DEPC-H<sub>2</sub>O를 섞어 총 11 µL가 되게 한 후 70°C에서 5 min간 반응 후 얼음에 넣었다. 이후 5 × Reaction Buffer, RNase 억제제, dNTP를 넣고 37°C에서 5 min간 반응 후 M-MuLV를 넣고 다시 37°C에서 60 min간 반응시켜 역전사를 진행하였다. 이후 70°C에서 10 min간 가열하여 역전사 효소의 활성을 제거하였다.

계속해서 상기의 반응 혼합물 3 µL를 취하여 PCR 반응에 사용하였다. 각각의 PCR은 TaKaRa Ex Taq DNA 중합효소(5 U/µL, TaKaRa), 10 × Ex Taq Buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP Mixture 및 25 pM의 적절한 sense 또는 antisense PCR 프라이머(Table 1)를 함유하는 반응 혼합물 20 µL 내에서 Perkin-Elmer Cyler 9600 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster, CA)를 사용하여 수행하였다. PCR 반응 조건은 다음과 같다. 94°C에서 5 min간 한번의 변성 사이클을 거친 다음 94°C에서 1 min, 55°C에서 1 min 및 72°C에서 1 min 30 s간의 cycle을 30회 반복하였다. PCR 결과를 agarose gel에 전기영동하고, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하였다. GAPDH를 증폭한 결과를 표준화를 위한 기준으로 삼았다.

2.4. HA-ELISA

위에서 언급한 대로 세포 배양을 수행한 후 kaempferol 과 quercetin에 의해 합성이 촉진되어 배지로 분비된 HA의 양을 알아보기 위하여 배지를 수거하여 ELISA를 수행하였다.

위의 세포 배양을 통해 수거한 배지를 HA-ELISA Kit를 이용하여 kaempferol과 quercetin에 의해 HaCaT 세포에서 합성되어 배지로 배출되는 HA 합성량을 정량하였다.

2.5. MTT Assay

처리 농도에서 세포 독성을 알아보기 위하여 96 well plate에 1 × 10<sup>4</sup>/well의 세포를 분주하고 위의 조건으로 배양하여 MTT Assay kit 내의 protocol에 따라 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 통계 분석

데이터 분석은 SPSS package program (SPSS, Inc., Chicago, IL)을 사용하여 수행하였으며 유의성은 p < 0.05 기준으로 고려되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. HA 합성 유전자 발현에 미치는 영향

HaCaT 세포에서 kaempferol과 quercetin, retinoic acid를 처리한 후 HA 합성 효소의 발현을 mRNA 수준에서 살펴보았다.

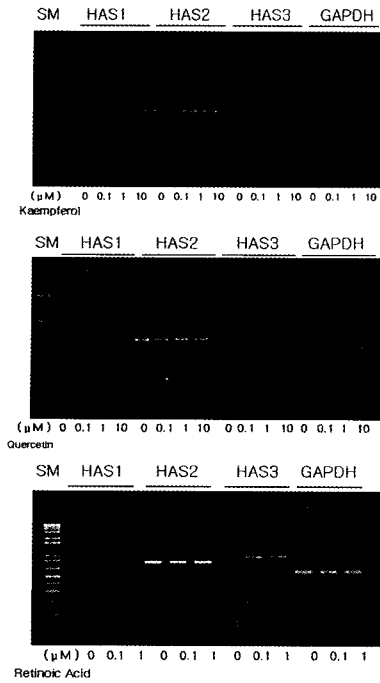
HA 합성 효소 중 HAS2 유전자의 경우 DMSO와 물질 처리군에서 모두 발현되는 것을 확인할 수 있었고 HAS3의 경우는 DMSO에서는 소량 검출되었으나 1 µM과 10 µM 농도의 kaempferol과 quercetin을 처리한 세포에서 다소 증가한 것을 알 수 있었다. 양성대조군으로 사용한 retinoic acid의 경우는 0.1 µM과 1 µM 모두에서 HAS3가 많이 발현되는 양상을 보였다.

3.2. HA 합성량에 미치는 영향

HaCaT 세포에서 kaempferol과 quercetin을 농도별로

Table 1. HAS1, 2, 3 Specific Primer Set

Primer name		Sequence
HAS1	Forward	5-AGG TCA TGT ACA CAG CCT TC-3
	Reverse	5-CAG CAG AGG GAC GTA GTT AG-3
HAS2	Forward	5-GCT ACC AGT TTA TCC AAA CG-3
	Reverse	5-GGA GTT TCT GTA CAT TCC CA-3
HAS3	Forward	5-GAG GAC TGG TAC CAT CAG AA-3
	Reverse	5-ACC GTT CTT TGC ATT TTA GA-3



**Figure 2.** Effects of kamperol, quercetin and retinoic acid on HAS mRNA expression. S.M.: size marker, HAS: hyaluronic acid synthase expected size: HAS1 (914 bp), HAS2 (819 bp), HAS3 (972 bp).

처리한 후 HA 합성이 촉진되어 배지로 배출되는 양을 HA-ELISA kit를 이용하여 정량화 하였다.

통계 분석을 통해 살펴본 결과, kaempferol과 quercetin 모두 1 μM과 10 μM의 처리 농도에서 무처리에 비해 유의성(p < 0.05) 있는 증가 결과를 보였다. 양성대조군인 retinoic acid 역시 0.1 μM과 1 μM에서 HA 합성을 촉진 시킴을 알 수 있었다.

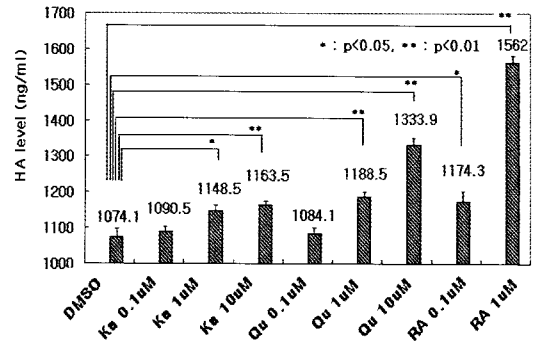
**3.3. 처리 물질의 세포 독성에 대한 영향**

처리 물질의 해당 농도에서 세포 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다.

처리 물질인 kaempferol, quercetin, retinoic acid 모두 처리 농도에서 무처리군에 비해 95%의 신뢰도로 통계적으로 유의하게 세포 독성이 없음을 확인할 수 있었다.

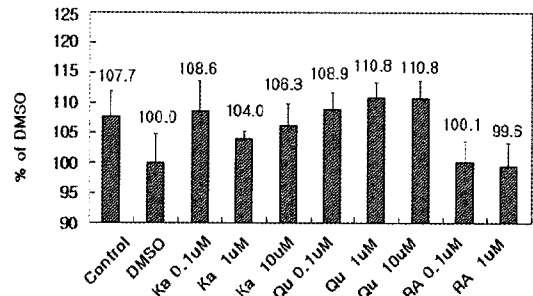
Hyaluronan은 친수성과 소수성의 양면을 모두 가지고 있어 친수성에 관해서는 각질층의 수분환경과 연관이 있을 것으로 생각되고 소수성 부분은 세포간 지방질과 관련이 있을 것으로 여겨진다[19]. 최근의 표피에서 hyaluronan synthase 유전자들의 cloning과 각질층 hyaluronan의 발견은 기존의 진피에 초점이 맞추어지고 단순히 외부에서 첨가하는 용도로만 생각했던 hyaluronan의 연구 방향을 표피세포 내에서의 작용과 내부인자를 통한 증가

**Hyaluronan Synthesis**



**Figure 3.** Effects of kamperol, quercetin and retinoic acid on HA synthesis (Ka: kaempferol, Qu: quercetin, RA: retinoic acid).

**MTT Assay**



**Figure 4.** Effects of kaempferol, quercetin and retinoic acid on cytotoxicity (Ka: kaempferol, Qu: quercetin, RA: retinoic acid).

측면으로 전환시키고 있다. 진피에 초점이 맞추어진 그리고 단순히 도포에 의미를 두고 있던 hyaluronan을 과학적으로 표피로 끌어내었고 앞으로 표피에서의 hyaluronan에 대한 연구와 기전, 관련 물질 등에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되어진다.

**4. 결 론**

본 연구를 통해 flavonoid류인 kaempferol과 quercetin을 인체 표피 피부 세포주, 즉 각질형성 세포주인 HaCaT에 처리하였을 때, HAS 유전자 발현의 증가와 이로 인한 HA 합성량의 증가를 확인하였다.

HA 합성을 촉진하는 효능이 있는 것으로 밝혀진 kaempferol과 quercetin은 HA를 이용하는 각종 피부 외용제의 유효성분으로 사용하여 피부 탄력 증진, 건조 방지, 노화 방지 등의 용도로 사용될 수 있을 것으로 생각되어진다.

## 참고 문헌

1. R. Fleischmajer, J. S. Perlish, and R. I. Bashey, Human dermal glycosaminoglycans and aging, *Biochem. Biophys. Acta.*, **279**(2), 265 (1972).
2. M. O. Longas, C. S. Russell, and X. Y. He, Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging, *Carbohydr. Res.*, **159**(1), 127 (1987).
3. I. Ghersetich, T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, and G. Dini, Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging, *Int. J. Dermatol.*, **33**(2), 119 (1994).
4. P. Heldin, T. C. Laurent, and C. H. Heldin, Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts, *Biochem. J.*, **258**(3), 919 (1989).
5. P. Heldin, T. Asplund, D. Ytterberg, S. Thelin, and T. C. Laurent, Characterization of the molecular mechanism involved in the activation of hyaluronan synthetase by platelet-derived growth factor in human mesothelial cells, *Biochem. J.*, **283**(Pt1), 165 (1992).
6. M. Suzuki, T. Asplund, H. Yamashita, C. H. Heldin, and P. Heldin, Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 involves activation of protein kinase C, *Biochem. J.*, **307**(Pt3), 817 (1995).
7. E. Tirone, C. D. Alessandris, V. C. Hascall, G. Siracusa, and A. Salustri, Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1), *J. Biol. Chem.*, **272**(8), 4787 (1997).
8. R. Tammi, J. A. Ripellino, R. U. Margolis, H. I. Maibach, and M. Tammi, Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in skin organ culture, *J. Invest. Dermatol.*, **92**(3), 326 (1989).
9. H. Akiyama, M. Saito, G. Qiu, T. Toida, and T. Imanari, Analytical studies on hyaluronic acid synthesis by normal human epidermal keratinocytes cultured in a serum-free medium, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**(3), 361 (1994).
10. H. Sobel and R. A. Cohen, Effect of estradiol on hyaluronic acid in the skin of aging mice, *Steroids*, **16**(1), 1 (1970).
11. J. P. Bentley, R. M. Brenner, A. D. Linstedt, N. B. West, K. S. Carlisle, B. C. Rokosova, and N. MacDonald, Increased hyaluronate and collagen biosynthesis and fibroblast estrogen receptors in macaque sex skin, *J. Invest. Dermatol.*, **87**(5), 668 (1986).
12. K. Miyazaki, T. Hanamizu, R. Iizuka, and K. Chiba, Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **15**(3), 175 (2002).
13. P. H. Weigel, V. C. Hascall, and M. Tammi, Hyaluronan synthases, *J. Biol. Chem.*, **272**(22), 13997 (1997).
14. J. P. Pienimaki, K. Rilla, C. Fulop, R. K. Sironen, S. Karvinen, S. Pasonen, M. J. Lammi, R. Tammi, and V. C. Hascall, Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan, *J. Biol. Chem.*, **276**(23), 20428 (2001).
15. S. Kim, B. Y. Kang, S. Y. Cho, D. S. Sung, H. K. Chang, M. H. Yeom, D. H. Kim, Y. C. Sim, and Y. S. Lee, Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronan in hairless mouse skin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **316**, 348 (2004).
16. S. Karvinen, S. Pasonen-Séppänen, J. M. Hyttinen, J. P. Pienimaki, K. Torronen, T. A. Jokela, M. I. Tammi, and R. Tammi, Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthase 2 and 3, *J. Biol. Chem.*, **278**(49), 49495 (2003).
17. T. Sayo, S. Sakai, and S. Inoue, Synergistic effect of N-acetylglucosamine and retinoids on hyaluronan production in human keratinocytes, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **17**, 77 (2002).
18. T. Sayo, Y. Sugiyama, Y. Takahashi, N. Ozawa, S. Sakai, O. Ishikawa, M. Tamura, and S. Inoue, Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 43 (2002).
19. S. Sakai, R. Yasuda, T. Sayo, O. Ishikawa, and S. Inoue, Hyaluronan exists in the normal stratum

- corneum, *J. Invest. Dermatol.*, **114**, 1184 (2000).
20. S. Sakai, T. Sayo, S. Kodama, and S. Inoue, N-methyl-L-serine stimulates hyaluronan production in human skin fibroblasts, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **12**, 276 (1999).
  21. Y. Sugiyama, A. Shimada, T. Sayo, S. Sakai, and S. Inoue, Putative hyaluronan synthase mRNA are expressed in mouse skin and TGF- $\beta$  upregulates their expression in cultured human skin cells, *J. Invest. Dermatol.*, **110**, 116 (1998).
  22. K. Fukuda, M. Takayama, M. Ueno, M. Oh, S. Asada, F. Kumano, and S. Tanaka, Hyaluronic acid inhibits interleukin-1-induced superoxide anion in bovine chondrocytes, *Inflamm. Res.*, **46**, 114 (1997).
  23. W. Manuskiatti, and H. I. Maibach, Hyaluronic acid and skin; wound healing and aging, *Int. J. Dermatol.*, **35**, 539 (1996).
  24. S. I. Lamberg and A. C. Stoolmiller, Glycosaminoglycans. A biochemical and clinical review, *J. Invest. Dermatol.*, **63**, 433 (1974).
  25. O. Tokusoglu, HPLC-UV and GC-MS characterization of the flavonol aglycons quercetin, kaempferol, and myricetin in tomato pastes and other tomato-based products, *Acta Chromatographica*, **13**, 196 (2003).
  26. H. P. Ciolino, P. J. Daschner, and G. C. Yeh, Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially, *Biochem. J.*, **340**, 715 (1999).