

## 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 세포 보호 작용과 항산화 활성

조 나 래 · 박 민 아 · 채 교 영 · 박 수 아 · 전 소 하 · 하 지 훈 · 박 수 남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 정밀화학과 나노바이오화장품연구실 화장품종합기술연구소  
(2012년 5월 23일 접수, 2012년 9월 10일 수정, 2012년 9월 20일 채택)

### Cellular Protective and Antioxidative Activities of *Parthenocissus tricuspidata* Stem Extracts

Na Rae Jo, Min A Park, Kyo Young Chae, Su Ah Park, So Ha Jeon,  
Ji Hoon Ha, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, Nanobioscosmetic laboratory, and Cosmetic R&D center,  
Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea  
(Received May 23, 2012; Revised September 10, 2012; Accepted September 20, 2012)

**요약:** 본 연구에서는 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 HaCaT 세포와 사람 적혈구 세포에서의 세포 보호 효과 및 항산화능을 측정하였다. HaCaT 세포를 이용한 실험에서, 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 각각 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 독성을 나타내지 않았다. 10 mM의  $\text{H}_2\text{O}_2$  및 30  $\mu\text{M}$ 의 rose bengal을 HaCaT 세포에 처리하였을 때, 에틸아세테이트 분획(6.25 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 및 아글리콘 분획(6.25 ~ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )은 농도 의존적으로 세포를 보호하였다. 적혈구 광용혈에서 담쟁이덩굴 줄기 추출물은 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대표적인 지용성 항산화제인  $\alpha$ -토코페롤보다도 큰 세포보호효과를 나타내었다. 담쟁이덩굴 줄기 추출물 에틸아세테이트 분획의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 18.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 나타내었다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 총항산화능(OSC<sub>50</sub>)은 에틸아세테이트 분획의 경우 1.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 아글리콘 분획은 1.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대표적 항산화제인 L-ascorbic acid (OSC<sub>50</sub> = 1.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 유사한 항산화능의 크기를 나타내었다. 이상의 결과들은 담쟁이덩굴 줄기 추출물이 ROS에 대하여 세포를 보호함으로써 생체, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 세포보호제 및 천연항산화제로서 작용할 수 있음을 가르킨다.

**Abstract:** In this study, the cellular protective effects on HaCaT cells and human erythrocytes and antioxidative effects of *P. tricuspidata* stem extracts were investigated. The ethyl acetate (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and aglycone fraction (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of *P. tricuspidata* stem extracts doesn't show any characteristics of cytotoxicity. When HaCaT cells were treated with 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 30  $\mu\text{M}$  rose bengal, the ethyl acetate (6.25 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and aglycone (6.25 ~ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fraction protected the cells against the oxidative damage in a concentration dependent manner. The *P. tricuspidata* stem extracts showed more prominent cellular protective effect than (+)- $\alpha$ -tocopherol, known as lipid antioxidant at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The ethylacetate fraction of *P. tricuspidata* stem extracts (18.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showed more free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC<sub>50</sub>). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activity (OSC<sub>50</sub>) of *P. tricuspidata* stem extracts on ROS generated in  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  system was investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The ethyl acetate (1.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and the aglycone fraction (1.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showed similar ROS scavenging activity of L-ascorbic acid (1.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). These results indicate that extract/fractions of *P. tricuspidata* stem extracts can function as natural cytoprotective agents and antioxidants in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by protecting cellular membrane against ROS.

**Keywords:** *parthenocissus tricuspidata* stem extracts, cellular protective effect, reactive oxygen species, antioxidative activity

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

## 1. 서 론

피부는 인체의 가장 바깥층에 존재하는 기관으로 항상 산소와 접촉하고 있고 또한 태양 자외선에 쉽게 노출되는 환경에 접하고 있다. 자외선은 파장에 따라 UVC (200 ~ 280 nm), UVB (280 ~ 320 nm), UVA (320 ~ 400 nm)의 3가지로 나누어진다. UVC는 자외선 영역 중에서 생물학적인 손상을 가장 많이 유발할 수 있지만, 대부분은 지구 대기의 성층권에 있는 오존층에서 흡수되어 지표상에는 거의 도달하지 않는다. 따라서 태양 자외선 중 UVC는 사람에게 있어서 피부 질환을 일으키는 그 역할은 매우 미미한 편이다. 하지만 UVB와 UVA는 피부암을 포함하는 다양한 피부병을 유발하기도 한다 [1,2]. 피부가 자외선을 받으면 피부에서는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 활성산소란  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 같은 비라디칼종과  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ 과 같은 산소 중심의 라디칼들 그리고 생체 성분과 활성산소와의 반응에서 유래된  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{ROOH}$  및  $\text{HOCl}$  등을 말하며 이들은 피부에서 지속적인 광산화적 반응에 의한 피부 세포 및 조직 손상과 함께 광노화를 가속화시킨다 [3-10].

$^1\text{O}_2$ 은  $\cdot\text{OH}$ 와 함께 활성산소 중에서 반응성이 가장 큰 활성산소로 주로 광증감반응에 의해 피부에서 생성된다. 생체내에는 이를 제거할 수 있는 효소가 존재하지 않기 때문에 특히 피부노화에 있어 주도적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [11,12].  $^1\text{O}_2$ 은 사람의 피부 섬유아세포에서 MMPs (matrix metalloproteinases)의 발현을 유발시키고, 또한 UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을  $^1\text{O}_2$ 이 매개할 수 있음도 보고되고 있다. MMP-1은 콜라겐 분해효소이다. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 주름 생성이 수반되는 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다 [13-18].

피부에는  $^1\text{O}_2$ 을 비롯한 활성산소종에 대하여 세포 및 조직을 보호하는 superoxide dismutase (SOD), 카탈라아제, 글루타치온퍼옥시다제 등의 항산화 효소와  $\alpha$ -tocopherol 및 ascorbic acid 등의 비효소적 항산화들로 이루어진 피부항산화 방어망이 구축되어 있다. 그러나 과잉의 활성산소종이 생성되면 피부에 존재하는 효소 및 비효소적 항산화제는 파괴되고 이어 피부 항산화방어망이 붕괴된다. 이러한 산화적 스트레스가 계속되면 세포 및 조직이 손상되고 결과적으로 탄력감소, 주름 및 멜라닌 생성과 같은 피부노화가 가속화된다. 따라서 피부노

화를 지연시키고 방지하기 위해서는 피부에서 생성된 활성산소를 효율적으로 제거하여 활성산소로부터 세포 및 조직을 보호할 수 있는 항산화제 개발이 필요하다 [10, 18-20].

담쟁이덩굴(*Parthenocissus tricuspidata* (sieb.et Zucc.) Planch.)은 포도과(Vitaceae)에 속하는 낙엽 활엽의 만목으로서 한국, 중국 및 일본, 대만, 만주, 유럽에도 분포하며 외국에서는 담쟁이덩굴을 Boston Ivy 또는 Japanese Ivy라고 부른다. 이들의 덩굴손은 잎과 대로 성장하며 끝에 등근 흡착근이 존재하여 바위나, 오래된 건물, 또는 소나무의 높은 곳까지 오를 수 있으며 보통 길이가 10 m 이상 자라는 식물이다. 민간의약에서는 뿌리와 잎을 약용하며 관절염, 후두염, 황달, 치통, 신경통 등에 사용해왔다. 주성분으로는 quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside (Miquelianin)와 quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoquercitrin) 등의 배당체가 알려져 있으며 [23], 담쟁이덩굴 잎에서 caffeic acid의 배당체들이 밝혀졌다 [29]. 담쟁이덩굴의 줄기에서는 resveratrol과 resveratrol의 dimer에 대하여 분리 보고되었으며 [25] 이외에 (+)-catechin, piceatannol, tricuspidatoa A, pallidol, quadrangularins A, betulfol A, myrciaphenone A, 수종의 stilbene dimers와 glucoside가 확인되었다 [21-27].

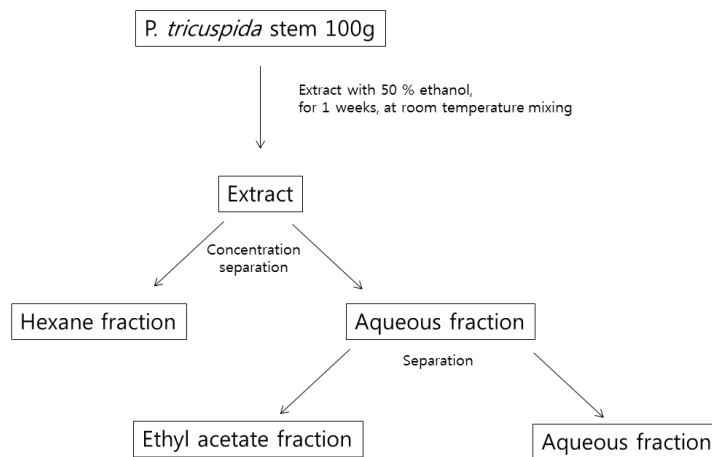
담쟁이덩굴의 생리활성으로는 항말리아, 항균효과, nitric oxide 저해효과 그리고 강력한 항암 효과가 보고된 바 있다 [28-30].

그러나 담쟁이덩굴 줄기의 산화적 손상에 대한 세포보호능 및 항산화 활성에 대한 연구는 이루어져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 HaCaT 세포 및 사람 적혈구 세포에 광증감제인 rose bengal 처리를 통해 발생된  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호 효과 및  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 유도된 HaCaT 세포에 대한 보호 효과를 확인하였다. 또한 담쟁이덩굴 줄기의 항산화능 평가를 위하여 free radical 소거능 및  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에서의 총 항산화능을 평가를 통해 담쟁이덩굴 줄기의 활성산소에 대한 세포 손상의 보호제 및 천연항산화제로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 기기 및 시약

본 실험에서 사용된 UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학



**Scheme 1.** Scheme for preparation of fractions from *P. tricuspidata* stem.

발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Istek (Korea)사 제품을 사용하였다.

(+)- $\alpha$ -Tocopherol, L-ascorbic acid, EDTA (ethylene-diamine tetraacetic acid), luminol, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다.  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, 그리고 에탄올, 에탄올, 에틸아세테이트(EtOAc), 헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

## 2.2. 담쟁이덩굴 줄기의 분획 및 추출

실험에 사용한 건조된 담쟁이덩굴은 2011년 10월경 서울 경동시장에서 구입하였다. 건조된 담쟁이덩굴 줄기 100 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 1 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 헥산을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 에틸아세테이트 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 에틸아세테이트 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용하여 당을 제거시킨 후 얻은 아글리콘 파우더를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 에틸아세테이트 분획 일정량에  $\text{H}_2\text{SO}_4$  및 아세트 용액을 넣고, 4 h 동안 증탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 에틸아세테이트 층

을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다 (Scheme 1).

## 2.3. HaCaT 세포 보호 효과 측정

### 2.3.1. 세포 배양

사람 각질형성 세포주인 HaCaT 세포는 Dr. Fusenig (German Cancer Research Center, DKFZ)로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)는 10 % fetal bovine serum (PAA, Austria), 1 % penicillin-streptomycin (PAA, Austria)을 혼합하여 사용하였고, 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다.

### 2.3.2. $\text{H}_2\text{O}_2$ 처리

96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well로 부착시킨 HaCaT 세포에 정상배지 혹은 농도별 담쟁이덩굴 줄기 추출물이 함유된 배지를 넣고 30 min 배양 후, 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 함유한 배지를 처리하여 30 min 동안 배양하였다.

### 2.3.3. Rose Bengal 처리

96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well로 부착시킨 HaCaT 세포에 정상배지 혹은 농도별 담쟁이덩굴 줄기 추출물이 함유된 배지를 넣고 30 min 배양 후, 30  $\mu\text{M}$  rose bengal를 함유한 배지를 처리하여 15 min 광조사 하였다.

### 2.3.4. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phe-

nytetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay로 측정하였다. 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용하여 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 방법으로 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.

HaCaT 세포를 96 well plate에서 24 h 동안 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건으로 항온 배양한 후, 각 농도별로 담쟁이덩굴을 처리한 세포에 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 μM rose bengal을 처리하였다. 시료 처리 후, 24 h 동안 배양한 세포를 PBS로 세척하고 MTT 용액(2 μg/mL)을 첨가하여 3 h 동안 반응시킨 후, 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 570 nm에서 측정하였다.

아무것도 처리를 하지 않은 비조사군을 음성대조군으로 하여 100 % 기준으로 잡아 상대적인 세포 생존율을 구하였다. 시료를 처리하지 않은 조사군을 양성대조군으로 하였으며, 세포의 생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율}(\%) = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

## 2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

### 2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer (pH 7.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 9.6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O. D (optical density)가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5 × 10<sup>7</sup> cells/mL이었다.

### 2.4.2. 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 μL씩 첨가하고 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 μM) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing

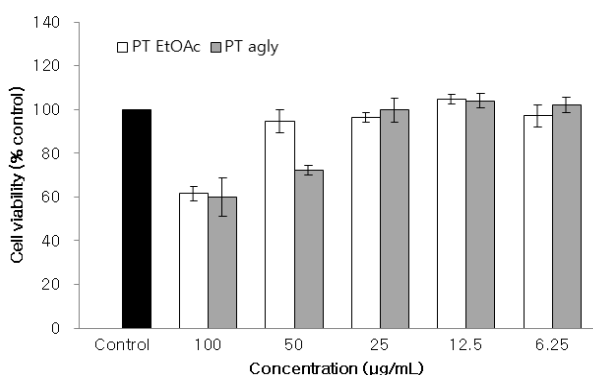
film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 × 20 × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 광조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인 τ<sub>50</sub>을 구하여 비교하였다. 대조군(control)은 τ<sub>50</sub>이 29 min으로 오차범위 ± 1.6 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다.

## 2.5. 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 항산화 효과 측정

### 2.5.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 법은 피부 노화의 원인으로 알려져 있는 free radical에 대하여 식물 추출물의 항산화 효능을 간단히 확인하기 위한 경우나 항산화 화장품 원료들의 활성을 비교하기 위한 실험방법이다. 따라서 DPPH를 이용하여 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 free radical 소거활성을 측정하였다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도 (free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>, μg/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = \left\{ 1 - \left[ \frac{(A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}})}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$



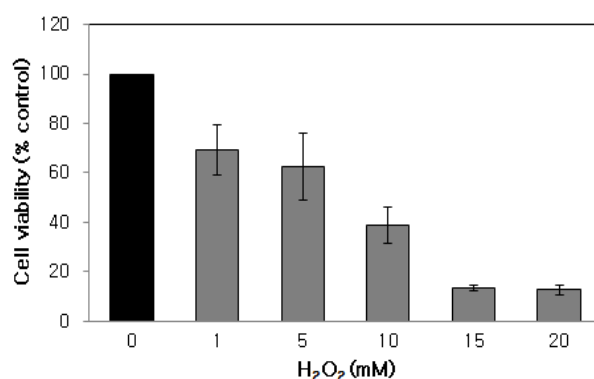
**Figure 1.** Cell viability of *P. tricuspidata* stem extract by MTT assay.

2.5.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계는 각종 활성산소 (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, •OH 그리고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 생성시키고, 철은 이 반응에서 촉매로 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 활성산소종에 대한 총항산화능을 측정할 수 있는데 이 총항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. 생성된 활성산소종의 검출은 이들과 luminol의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 담쟁이덩굴 줄기추출물을 넣었다. 여기에 25 mM EDTA 40 µL 및 5 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10 µL를 가한 후 35 mM luminol 80 µL를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>, µg/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$



**Figure 2.** Cell viability on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage in HaCaT cell system. HaCaT cells were treated with 1, 5, 10, 15, 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and stained with MTT to show survival cells compared to non-treated group.

3. 결 과

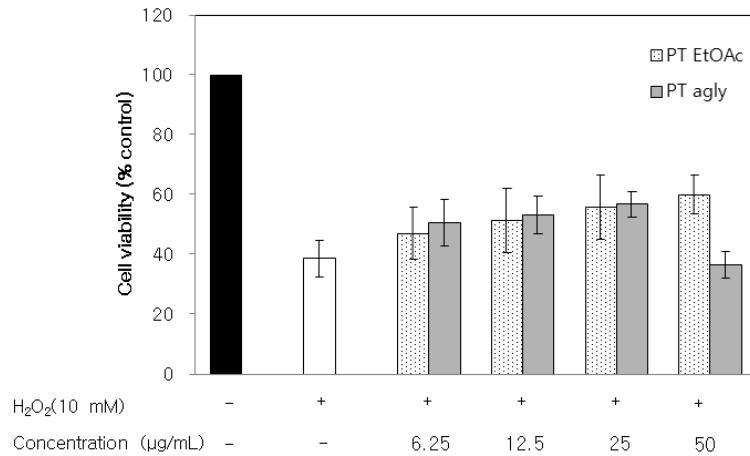
3.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 HaCaT 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

3.1.1. 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 세포 독성 평가

담쟁이덩굴 줄기 추출물의 세포 독성에 미치는 농도를 조사하고, 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 MTT assay를 시행하였다. HaCaT 세포에 대한 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 세포 독성을 측정된 결과 에틸아세테이트 분획에서는 100 µg/mL 이상 농도에서 독성을 나타내었으며 아글리콘 분획에서는 50 µg/mL 이상 농도에서 독성을 나타내었다(Figure 1). 따라서 본 연구에서는 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 세포보호 효과를 측정하기 위한 최고 농도는 50 µg/mL로 설정하였다.

3.1.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도별 처리에 따른 HaCaT 세포의 생존율

자외선에 의해 발생되어 산화적 손상을 유발하는 활성산소인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 HaCaT 세포를 대상으로 농도별로 (1, 5, 10, 15, 20 mM) 처리하고 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다. 1 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 경우는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 경우에 비해 약 69 %의 세포 생존율을 나타내었다. 5 mM인 경우 세포 생존율은 62 %, 10 mM은 39 %, 15 mM은 14 % 그리고 20 mM에서는 13 %의 생존율을 나타내었다(Figure 2). 본 연구에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로부터 세포보호 효과를 측정하기 위한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도는 39 %의 세포 생존율을 나타낸 10 mM를 이용하였다.



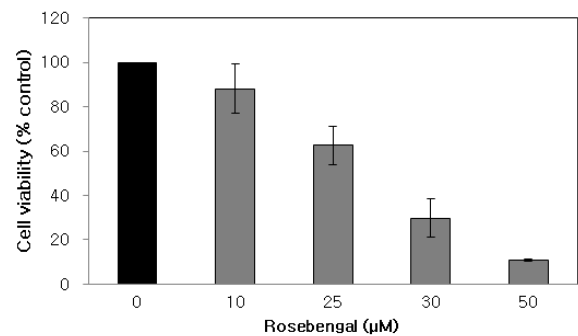
**Figure 3.** Cellular protective effect (cell viability) of *P. tricuspidata* stem extract on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage in HaCaT cell system. HaCaT cells were treated with 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and stained with MTT to show survival cells compared to non-treated group.

3.1.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과  
농도별 담쟁이덩굴 줄기 추출물을 처리한 후에 HaCaT 세포에 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 함유한 배지를 처리한 후, 30 min 배양하여 PBS로 세척하였다. 24 h 배양한 세포의 생존율을 MTT assay를 통해 측정하였다. 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 세포 생존율은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 대조군에 비하여 39 %의 생존율을 나타내었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 전 HaCaT 세포에 6.25, 12.5, 25 및 50 µg/mL의 담쟁이덩굴 줄기 에틸아세테이트 분획을 처리한 경우 세포 생존율은 47, 52, 56 및 60 %로, 담쟁이덩굴 줄기 에틸아세테이트 분획은 농도 의존적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 세포의 사멸을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다(Figure 3). 또한 6.25, 12.5, 25 및 50 µg/mL의 담쟁이덩굴 줄기 아글리콘 분획을 처리한 경우 51, 53, 57 및 36 %로 25 µg/mL 이하의 농도에서는 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 갖으나 50 µg/mL에서는 앞선 실험에서와 같이 세포 독성을 갖는 것으로 나타났다(Figure 3).

### 3.2. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 HaCaT 세포의 손상에 대한 세포보호 효과

#### 3.2.1. Rose Bengal 농도별 처리에 따른 HaCaT 세포의 생존율

HaCaT 세포를 대상으로, 광노화에 있어서 주요한 활성산소인 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>을 발생시키는 rose bengal을 농도별(10, 25, 30, 50 µM)로 처리하고 세포 생존율을 측정하였다. 10 µM의 rose bengal을 처리한 경우는 rose bengal을 처리하지

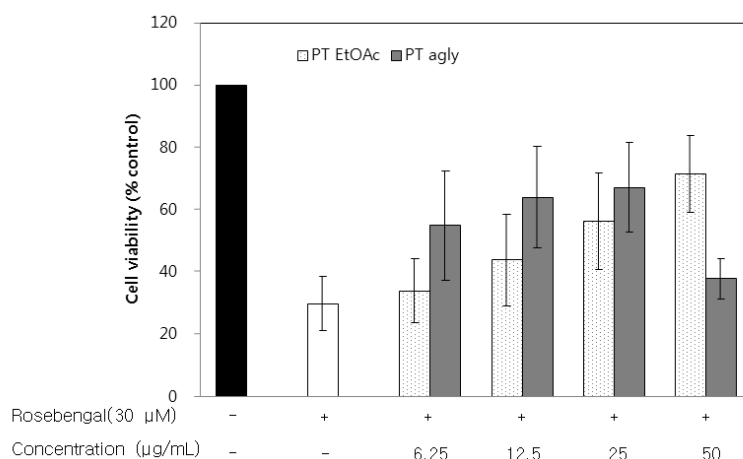


**Figure 4.** Cell viability on <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-induced cell damage in HaCaT cell system. HaCaT cells were treated with 10, 25, 30, 50 µM rose bengal and stained with MTT to show survival cells compared to non-treated group.

않은 경우에 비해 88 % 정도의 세포 생존율을 나타내었다. 25 µM 인 경우 세포 생존율은 62 %를 나타내었고, 30 µM은 30 %, 50 µM은 10 %의 생존율을 나타내었다(Figure 4). 본 연구에서는 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 세포 손상으로 부터 세포 보호 효과를 측정하기 위한 rose bengal의 농도는 30 %의 세포 생존율을 나타낸 30 µM을 이용하였다.

#### 3.2.2. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 HaCaT 세포의 손상에 대한 세포보호 효과

HaCaT 세포에 담쟁이덩굴 줄기 추출물을 농도별로 처리한 후에 30 µM의 rose bengal을 함유한 배지를 넣고 15 min 동안 광조사한 후 세포를 PBS로 세척하였다. 24 h



**Figure 5.** Cellular protective effect of *P. tricuspidata* stem extract on  $^1\text{O}_2$ -induced cell damage in HaCaT cell system. HaCaT cell was treated with 30  $\mu\text{M}$  rose bengal and stained with MTT to show cell viability compared to non-treated group.

동안 세포를 배양하고 세포의 생존율을 MTT assay로 측정하였다. 30  $\mu\text{M}$  rose bengal을 첨가한 경우는 rose bengal을 처리하지 않은 대조군 대비 세포 생존율은 30%를 나타내었다. Rose bengal을 처리하기 전에 HaCaT 세포에 6.25, 12.5, 25 및 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 담쟁이덩굴 줄기 에틸아세테이트 분획을 처리한 경우 세포 생존율은 각각 34, 44, 56 및 72%를 나타내었으며, 아글리콘 분획의 경우 55, 64, 67, 37%의 세포 생존율을 나타내었다. 따라서 담쟁이덩굴 줄기 추출물은 세포독성을 갖지 않는 농도에서 농도 의존적으로  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포 손상에 대하여 세포를 보호하는 효과가 있음을 보여 주었다(Figure 5).

### 3.3. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

활성산소에 의한 지질 과산화 반응, 구조 단백질의 절단, 단백질산화 현상 등의 세포손상에 대한 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 보호 효과를 Figures 6, 7에 나타내었다. 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간( $\tau_{50}$ )은 세포 보호 활성이 클수록 크게 나타난다. 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 50% 에탄올 추출물일 경우 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서  $\tau_{50}$ 이 각각 39.6, 43.0, 86.9, 227.9 min으로 농도 의존적으로 세포보호 효과를 나타내었으며 에틸아세테이트 분획의 경우 46.5, 60.3, 124.6, 175.7 min으로 나타났었다. 아글리콘 분획의 경우  $\tau_{50}$ 이 각각 100.5, 162.9, 244.1, 109.0 min으로 세포보호 효과를 나타내 농도 의존적으로 나타나지 않았다. 이는 아글리

콘 분획의 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 적혈구 세포에 대해 세포 독성을 나타내는 것으로 보이며 이는 위의 HaCaT 세포에 대한 세포 독성 평가에서와 유사한 결과를 나타냈다.

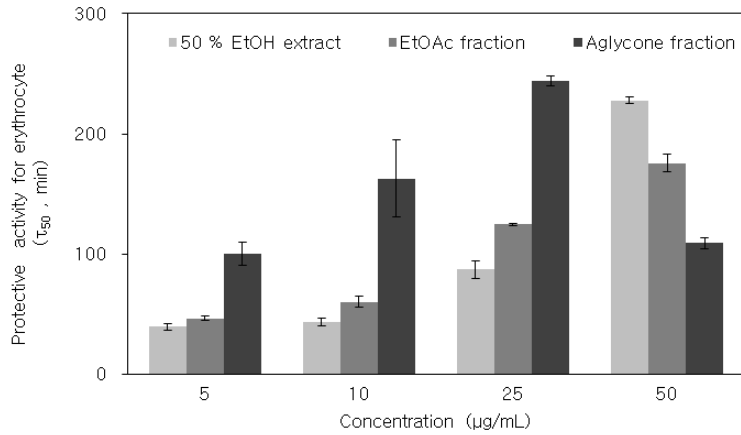
지질 과산화 연쇄반응의 차단제로 알려진 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 담쟁이덩굴 줄기 추출물 각각의 10  $\mu\text{g/mL}$ 에서 비교하였을 때 담쟁이덩굴 줄기의 아글리콘 분획(100.5 min) > 에틸아세테이트 분획(46.5 min) > 50% 에탄올 추출물(39.6 min)  $\geq$  (+)- $\alpha$ -tocopherol (38.00 min) 순으로 나타났다. 따라서 50% 에탄올 추출물은 비교물질인 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 비슷하였으나 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 세포 보호 효과가 뛰어나다는 것을 알 수 있다.

### 3.4. 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 항산화 활성

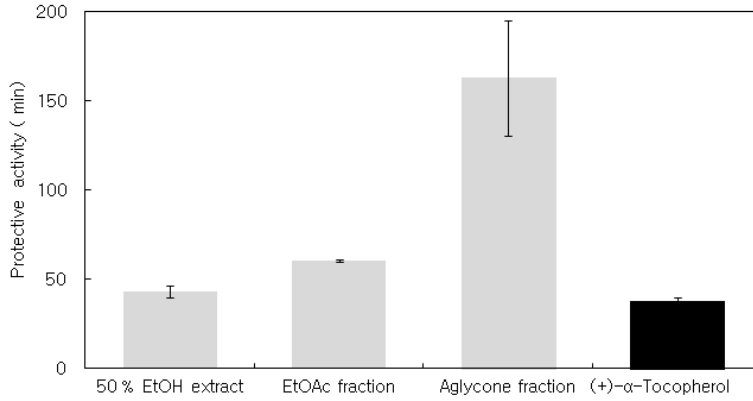
#### 3.4.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 자동산화과정은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응으로 생체 구성성분들을 산화적 손상을 일으킨다. 이를 막기 위하여 (+)- $\alpha$ -tocopherol, flavonoid 등의 항산화제가 자동산화 연쇄반응을 막기 위하여 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이때 수소원자의 환원력은 화합물 내 질소 중심의 라디칼로 비편재화 되어 안정한 자유 라디칼인 DPPH반응을 통하여 알아볼 수 있다.

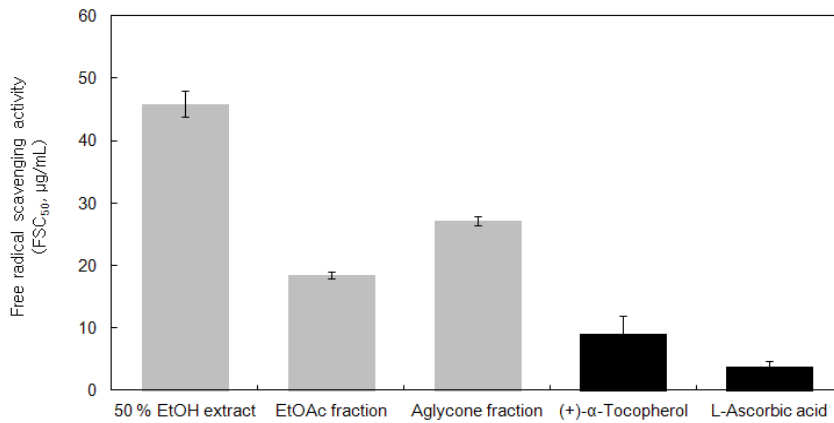
담쟁이덩굴 줄기 추출물과 비교물질인 (+)- $\alpha$ -tocopherol의 free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과는 Figure 8에



**Figure 6.** Cellular protective effects of *P. tricuspidata* stem extracts against <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-induced photohemolysis of human erythrocytes (Control = 29.9 ± 1.6 min).

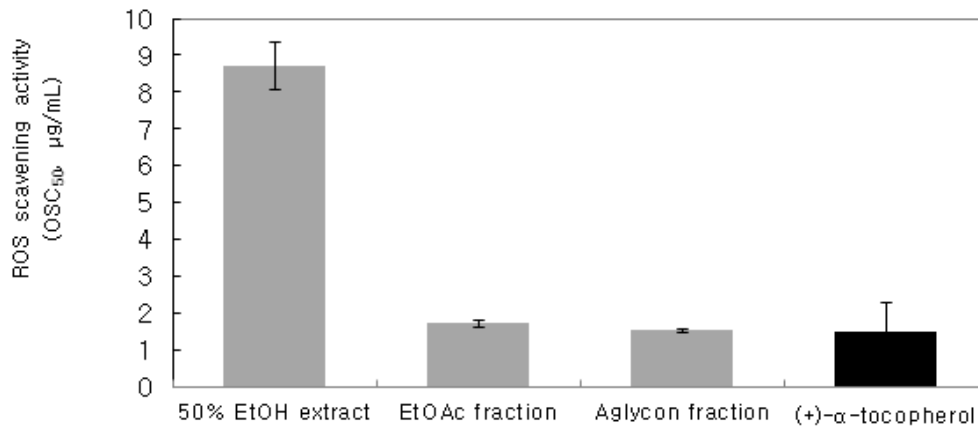


**Figure 7.** Cellular protective effects of extract and fractions obtained from *P. tricuspidata* stem and references at 10 µg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.



**Figure 8.** Free radical scavenging activity of extracts/fractions of *P. tricuspidata* stem and references.





**Figure 9.** Reactive oxygen species scavenging activity of *P. tricuspidata* stem extract and references in  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  system by luminol dependent chemiluminescence assay.

나타내었다. 담쟁이덩굴 줄기의 50 % 에탄올 추출물에 대한  $\text{FSC}_{50}$ 은  $45.87 \mu\text{g/mL}$ , 에틸아세테이트 분획은  $18.5 \mu\text{g/mL}$ , 아글리콘 분획은  $21.17 \mu\text{g/mL}$ 으로 에틸아세테이트 분획에서 가장 높은 활성이 나타났다.

한편 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol은  $\text{FSC}_{50}$ 이  $8.98 \mu\text{g/mL}$ , 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid는  $3.79 \mu\text{g/mL}$ 로서 DPPH 법을 이용한 free radical 소거활성은 L-ascorbic acid > (+)- $\alpha$ -tocopherol > 담쟁이덩굴 줄기의 에틸아세테이트 분획 > 아글리콘 분획 > 50 % 에탄올 추출물 순으로 나타났다.

#### 3.4.2. Luminol 화학발광법을 이용한 $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Luminol은  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에서 생성이 된 ROS로 인하여 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 되고 그 후에 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 luminol 화학발광법을 이용하여 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 ROS 소거활성(총항산화능,  $\text{OSC}_{50}$ ) 측정 결과를 Figure 9에 나타내었다.

담쟁이덩굴 줄기 추출물의  $\text{OSC}_{50}$ 은 50 % 에탄올 추출물  $8.97 \mu\text{g/mL}$ 과 에틸아세테이트 분획  $1.72 \mu\text{g/mL}$ , 아글리콘 분획  $1.53 \mu\text{g/mL}$ 로 나타내었다. 한편 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid의  $\text{OSC}_{50}$ 이  $1.50 \mu\text{g/mL}$ 으로 이러한 결과는 L-ascorbic acid > 담쟁이덩굴 줄기의 아글리콘 분획 > 에틸아세테이트 분획 > 50 % 에탄올 추출물 순으로 나타났다. 따라서 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트와 아글리콘 분획의 활성산소 소거활성이 비교물질과 유사함을 나타내었다.

## 4. 고 찰

피부 노화의 대표적 원인인 광노화는 피부가 태양광선에 노출될 때 자외선에 의해 야기된다. 피부가 자외선에 노출되면 광증감제 분자에 의한 태양 자외선의 흡수로 시작되는 광증감 반응이 나타나고 이로 인해 활성산소가 생성된다. 이러한 광증감 반응의 주 생성물은  $^1\text{O}_2$ 을 비롯하여  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  등을 포함한다. 본 연구에서는 HaCaT 세포 배양액에 광증감제 rose bengal을 첨가 후 광조사하여 생성된  $^1\text{O}_2$ 과 또 다른 활성산소인  $\text{H}_2\text{O}_2$ 처리에 의한 세포보호 효과를 조사하였다.

담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 세포독성을 갖지 않는 농도 범위에서 rose bengal에 의해 생성된  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 HaCaT 세포의 산화적 손상에 대하여 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었으며 또 다른 활성산소인  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리한 실험에서도 대조군보다 높은 HaCaT 세포의 생존율을 나타내었다.

또한 담쟁이덩굴 줄기 추출물을 사람 적혈구 세포에 처리하였을 때 HaCaT 세포에서와 마찬가지로  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 광용혈을 억제하는 효과를 나타내었으며 특히 아글리콘 분획의 경우 실험에 사용된 담쟁이덩굴 줄기 추출물 중 가장 우수한 광용혈 억제능을 나타내었다. 아글리콘 분획은 적혈구 광용혈 실험 및 위의 HaCaT 세포 이용 실험 모두에서 세포 독성을 갖지 않는 농도 범위에서 가장 우수한 세포 보호능을 보였다. 이러한 경향은 50 % EtOH 추출물 및 에틸아세테이트 분획의 성분들이 플라보노이드 배당체로 세포의 접근 및 침

투가 어려운 반면에 아글리콘 분획은 당이 제거된 플라보노이드 성분들로 인하여 세포막으로의 침투가 용이하고 세포막 불포화지질의 자동산화반응을 효율적으로 억제할 수 있기 때문에 사료된다.

담쟁이덩굴 줄기 추출물의 세포 보호능은  $^1\text{O}_2$ 의 소광 및 이차적으로 암반응에서 생성되는  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  등의 활성산소 소거작용 등 다양한 요인들이 복합적으로 일어난 결과라고 사료된다. 특히 담쟁이덩굴 줄기 추출물을 이용한 총항산화능 시험에서 우수한 항산화능 나타내었기 때문에 담쟁이덩굴 줄기 추출물이 우수한 항산화능을 통해 세포보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

$^1\text{O}_2$  및  $\text{H}_2\text{O}_2$  와 같은 활성산소종들은 피부의 광노화를 비롯한 피부 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다. 따라서 피부에 적절한 항산화제의 사용은 활성산소종의 생성을 감소시켜 피부 광노화 및 피부 질환등을 예방할 수 있다. 본 연구의 결과를 통해 담쟁이덩굴 줄기 추출물은 활성산소로 유도되는 세포 손상에 있어서 HaCaT 세포 및 사람의 적혈구 세포에 보호 효과를 갖으며, 우수한 항산화능을 가짐을 보여주었다. 따라서 담쟁이덩굴 줄기 추출물은 활성산소에 대한 세포 손상의 보호제 및 천연항산화제로서 응용가능성이 있다고 사료된다.

## 5. 결 론

1) 담쟁이덩굴 줄기의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 HaCaT 세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았다. 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 에틸아세테이트 분획은 세포 독성이 나타나지 않았으나 아글리콘 분획은 약간 나타났다.

2) 담쟁이덩굴 줄기의 에틸아세테이트 분획은 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 10 mM의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리한 HaCaT 세포의 생존율을 39 %에서 60 %까지 증가시켰으며 아글리콘 분획의 경우 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 57 %까지 증가시켰다. 따라서  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 대한 우수한 세포 보호 활성을 갖음을 확인할 수 있다.

3) 담쟁이덩굴 줄기의 에틸아세테이트 분획은 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 30  $\mu\text{M}$ 의 rose bengal을 처리한 HaCaT 세포의 생존율을 양성 대조군 30 %에서 72 %까지 증가시켰으며 아글리콘 분획은 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  67 %까지 증가시켰다. 이는  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 산화적 손상에 대한 담쟁이덩굴 추출물의 우수한 세포 보호 활성을 나타낸다.

4)  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 담쟁이덩굴 줄기 추출물 중 50 % 에탄올 추출물과 에틸아

세테이트 분획은 농도 범위(1 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 농도-의존적으로  $^1\text{O}_2$ 에 의해 유도된 용혈 억제하였으며, 아글리콘 분획 또한 1 ~ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 범위에서는 우수한 세포 보호 효과를 나타내었다. 비교 물질로 사용한 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 비교하였을 때 동일한 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 각각 1.2배, 2.6배 우수한 세포 보호 효과를 나타내었다.

5) 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 free radical 소거 능력 ( $\text{FSC}_{50}$ )은 50 % 에탄올 추출물의 경우 45.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 에틸아세테이트 분획의 경우 18.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 에틸아세테이트 분획에서 당을 제거시킨 아글리콘 분획의 경우 21.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 (+)- $\alpha$ -tocopherol (8.98  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 및 L-ascorbic acid (3.79  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 비해 낮은 free radical 소거능을 나타냈다.

6) 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 활성산소 소거활성 ( $\text{OSC}_{50}$ )은 50 % EtOH 추출물이 8.97  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 에틸아세테이트 분획이 1.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 아글리콘 분획이 1.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났으며 아글리콘 분획의 경우 L-ascorbic acid (1.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 유사한 활성을 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : A103017).

## 참 고 문 헌

1. F. Afaq, V. M. Adhami, and H. Mukhtar, Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis, *Mutat. Res.*, **571**, 153 (2005).
2. M. A. Bachelor and G. T. Bowden, UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression, *Semin., Cancer Biol.*, **14**, 131 (2004).
3. E. Cadenas, Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 79 (1989).
4. A. Naqui, B. Chance, and E. Cadenas, Reactive oxygen intermediate in biochemistry, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 137 (1986).
5. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Ann. J. Pathol.*, **107**, 397 (1982).

6. K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
7. C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems, In *Free Radical in Biology*, ed. W. A. Pryor, 2, 85, Academic press, New York (1976).
8. M. J. Steinbeck, A. U. Khan, and M. J. Karnovsky, Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap, *J. Biol. Chem.*, **267**, 13425 (1992).
9. S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
10. S. N. Park, Skin aging and antioxidants, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(1), 75 (1997).
11. J. Pincemail, Free radicals and antioxidants in human diseases, In *Analysis of Free radicals in Biology Systems*, eds. A. E. Favier, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave, and J. L. Pierre, 83, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland (1995).
12. J. R. Kanofsky, H. Hoogland, R. Wever, and S. J. Weiss, Singlet oxygen production by human eosinophils, *J. Biol. Chem.*, **263**, 9692 (1988).
13. A. Oikarinen, J. Karvonen, J. Uitto, and M. Hanuksela, Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation, *Photodermatology*, **2**, 15 (1985).
14. A. Oikarinen and M. Kalliainen, A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin, *Photodermatology*, **6**, 24 (1989).
15. L. H. Kilgman, UVA induced biochemical changes in hairless mouse skin collagen: A contrast to UVB effects, *Biological responses to Ultraviolet A Radiation*, ed. F. Urbach, 209, Valdemar, Overland Park (1992).
16. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of interstitial collagenase., *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
17. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
18. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissues of skin: Its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy. *Adv. Pharmacol.*, **38**, 639 (1997)
19. L. Packer, Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants, In: *Free radical damage and its control*, eds. C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon, 239, Elsevier Science, Amsterdam (1994).
20. J. J. Thiele, C. O. Barland, R. Ghadially, and P. M. Elias, Permeability and antioxidant Barriers in aged epidermis, *Skin Aging*, eds. B. A. Gilchrist, J. Krutman, 65, Springer, Berlin Heidelberg (2006).
21. H. K. Hwang, Flavonol glycosides from *Parthenocissus tricuspidata* Leaves, *J. Pharm. Soc. Korea*, **39**(3), 289 (1995).
22. I. H. Son, I. M. Chung, S. J. Lee, and H. I. Moon, Antiplasmodial activity of novel stilbene derivatives isolated from *Parthenocissus tricuspidata* from South Korea, *Parasitol. Res.*, **101**, 237 (2007).
23. M. J. Kim, S. Y. Shin, B. G. Koo, G. Baek, T. J. Kim, and J. K. Park, Synergic antimicrobial activity of chitosan with the ethanol extract from *Parthenocissus tricuspidata*, *J. Chitin Chitosan*, **16**(3), 177 (2011).
24. H. J. Jeong and C. H. Kim, Screening of the antioxidant defense systems from *Parthenocissus tricuspidata* PLANCH. *Korean J. Plant. Res.*, **14**(2), 116 (2001).
25. H. J. Kim, M. Saleem, S. H. SEO, C. Jin, and Y. S. Lee, Two new antioxidant stilbene dimer, Parhenostilbenins A and B from *Parthenocissus tricuspidata*. *Planta med.*, **71**, 973 (2005).
26. T. Tanaka, M. Ohama, K. Morimoto, F. Asai, and M. Inuma, A resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata*. *Pergamon*, **48**(7), 1241 (1998).
27. W. H. Park, S. J. Lee, and H. I. Moon, Antimalarial activity of a new stilbene glycoside from *Parthenocissus tricuspidata* in Mice. *AAC*, **52**(9), 3451 (2008).
28. M. Ohyama, T. Tanaka, T. Ito, M. Inuma, K. F. Bastow, and K. H. Lee, Antitumor agents 200. cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives. *Pergamon*, **9**, 3057 (1999).

29. M. Saleem, H. J. Kim, C. B. Jin, and Y. S. Lee, Antioxidant caffeic acid derivatives from leaves of *Parthenocissus tricuspidata*, *Arch. Pharm. Res.*, **27**(3), 300(2004).
30. T. Kundakovic, T. Stanojkovic, M. Milenkovic, J. Grubin, Z. Juranic, B. Stevanovic, and N. Kovacevic, Cytotoxic, antioxidant and Antimicrobial activities of *Ampelopsis Brevipedunculata* and *Parthenocissus Tricuspidata* (Vitaceae), *Arch. Biol. Sci.*, **60**(4), 641(2008).