가감당귀음자의 항산화 효과와 자외선으로 유도된 각질형성세포 손상에 대한 보호효과

김태연 · 박종필[1*]

1 : 세명대학교 한의과대학 예방의학교실, 2 : 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

Antioxidant and Protective Effects of Gagam-Danguieumja on Ultraviolet B-induced Damage in Human Keratinocytes

Tae Yeon Kim, Jong Phil Bak[1]*

Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Semyung University,
1 : Clinical Trial Center for Bio-Industry, Semyung University

In this paper, we studied the anti-oxidative capacities and protective effects of water extract of Gagam-Danguieumja(GDE) against Ultraviolet B(UVB)-induced oxidative damage in human keratinocytes(HaCaT). To evaluate the anti-oxidative activities of GDE, we measured scavenging activities on DPPH radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide anion, lipid peroxidation and reducing power of GDE. To detect the protective effects of GDE against UVB, we irradiated with 40 mJ/㎠'s UVB to HaCaT cells then we measured reactive oxygen species(ROS) generation, apoptotic bodies and cell viability using DCFH-DA assay, Hoechst 33342 staining and MTT assay. GDE showed the anti-oxidative activities by scavenging DPPH radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide anion, lipid peroxidation. Also GDE showed high reducing values. GDE reduced oxidative stress conditions by inhibition of ROS expression. Also the cell apoptosis by UVB-induced oxidative conditions was decreased by GDE treatment. These results could suggest that GDE had anti-oxidative activities and exhibited protective effects against UVB on HaCaT cells. GDE would be useful for the development of cosmetics treating UVB-induced skin aging.

keywords : Gagam-danguieumja(GDE), Ultraviolet B(UVB), Human keratinocytes(HaCaT), Anti-oxidative activity, Apoptosis, Reactive oxygen species(ROS)

서 론

피부노화는 시간, 환경적인 요인들(UV, 담배, 오염원) 및 호르몬 변화에 따른 내인성 및 외인성 요인의 복합적인 결과이다[1]. 최근 환경오염에 따른 오존층 파괴와 수명 연장으로 인체의 자외선 노출량이 날로 증대됨에 따라 자외선으로부터 피부를 보호하기 위한 광노화 관련 연구는 관심의 대상이 되고 있다[2].

광노화를 유도하는 자외선은 파장에 따라 피부 침투 정도가 달라지는데 280-320 ㎚의 자외선B(UVB)는 대체로 표피에서 흡수되므로 표피의 각질형성세포에 영향을 미친다[3]. 각질형성세포가 UVB에 과도하게 노출되면 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되는데[4], ROS는 실질적으로 피부의 효소적 그리고 비효소적 항산화 방어체계를 위태롭게 만들어 세포손상 및 세포사멸(apoptosis)을 야기시키고 광노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다[5-7]. ROS는 세포신호전달체계에 있어 중요한 매개자 역할을 하여[8], 피부 세포 내 여러 가지 신호전달체계를 활성화시키므로[3] 지질, 단백질, DNA, 단백질 분해효소, 콜라겐, 탄수화물 등을 손상시키게 된다[9]. 지질 과산화로 인한 세포막의 손상은 정상적인 세포의 기능을 떨어뜨리므로 피부의 광산화적 손상을 유도하며[4], DNA가 손상되면 세포는 세포주기를 멈추고 세포사멸(apoptosis)을 일으킨다[10].

당귀음자는 嚴의 『濟生方』[11]에 처음 수록된 처방으로 "治心血凝滯, 內蘊風熱, 發見皮膚, 遍身瘡疥"의 목적으로 입방되어 風熱血燥로 인한 피부 소양증, 瘡疥, 만성 두드러기 등을 치료하는데 응용되고 있다[12]. 가감당귀음자(Gagam-Danguieumja, GDE)[13]는 당귀음자에 淸熱解毒, 發散風熱, 溫補脾胃, 補陰益氣, 理氣燥濕 하는 수종의 약재를 가하여 陰血損傷, 脾虛氣血不調로 전변되는 만성 피부 질환에 사용하기 위하여 작방되었다.

당귀음자에 대한 연구로는 건선에 활용되는 가미당귀음자에 대

* Corresponding author
Jong Phil Bak, Clinical Trial Center for Bio-Industry, Semyung University, 65, Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea
·E-mail : violet805@hanmail.net ·Tel : +82-43-653-6409

·Received : 2015/10/02 ·Revised : 2015/10/21 ·Accepted : 2015/11/04

ⓒ The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.12.29.6.475
Available online at http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm

한 실험[14] 및 임상적 고찰[15,16], 당귀음자 수추출액이 항알러지 반응과 마우스의 면역세포기능에 미치는 영향[17], 가미당귀음자[18], 당귀음자가감방[19]과 외치방 병용[20,21]이 아토피 동물 모델에 미치는 영향, 항경련제 과민성 증후군 치험례 보고[22], 가감당귀음자의 항염증 효과[23] 등이 있다. 그러나 임상에서 아토피 피부염을 비롯한 각종 만성 피부 질환을 치료하는 처방으로 다용되고 있는 가감당귀음자의 항산화 효과 및 자외선으로 유발된 피부노화 조절과 관련된 연구는 보고되지 않았다.

최근 국민들의 생활수준이 향상되면서 피부와 관련된 기능성 화장품에 대한 관심과 수요가 급증함과 동시에 합성소재 화장품과 관련된 부작용이 지속적으로 제기되면서 효과적이면서도 독성이 없는 천연물을 이용한 기능성 화장품 개발연구가 더욱 중시되고 있다. 따라서 안전하고 효과가 우수한 처방들을 활용할 수 있는 한의학계에서도 피부노화를 예방하거나 개선할 수 있는 한방소재 발굴 연구에 대한 더욱 많은 노력들이 필요한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 UV에 의한 산화적 스트레스로 초래되는 손상에 항산화 작용을 통하여 각질형성세포를 보호할 수 있는 기능성 소재 발굴의 일환으로 가감당귀음자를 이용하여 항산화 및 자외선에 대한 항노화 효능을 확인하는 실험을 진행하여 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용된 가감당귀음자(Gagam-Danguieumja, GDE)의 한약재는 새롬제약(한국, 안성)에서 구입하였으며 세명대학교 부속한방병원에서 조제하였다(Table 1).

2) 시약

Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), DMSO는 Bio basic(Canada)으로부터, Hoechst 33342와 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 Thermo Fisher Scientific Inc.(Molecular probes, Eugene, OR, USA)로부터, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), iron(II) sulfate heptahydrate, hydrogen peroxide, 2-deoxy-D-ribose, thiobarbituric acid(TBA), trichloroacetic acid(TCA), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), peroxidase, potassium ferricyanide, linolenic acid 및 기타 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

3) 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용된 HaCaT 세포주는 Cell Line Service(passage 32, Germany)에서 분양 받았으며, 세포주를 배양하기 위하여 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), Fetal Bovine Serum(FBS), penicillin/streptomycin, Trypsin-EDTA 그리고 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS)는 Thermo Fisher Scientific Inc.(Gibco, USA)로부터 구입하였다. HaCaT 세포주를 배양하기 위하여 10% FBS와 100 unit/㎖ penicillin streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 동결된 HaCaT 세포주를 DMEM 배지를 이용하여 빠르게 해동시키고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 여분의 동결 보존액을 제거 하였다. 세포주에 10 ㎖의 DMEM 배지를 첨가하여 100 mm culture dish에 접종하고 37℃, 5% CO_2가 공급되는 조건에서 배양 하였다. 배지는 주 3회 교체하였으며 culture dish 바닥면적의 70% 이상 자랐을 때 계대배양 하였다. 계대배양 시 세포를 분리하기 위하여 0.25% Trypsin-EDTA를 사용하였다.

Table 1. Composition of Gagam-Danguieumja(GDE)

Herbal name	Scientific name	Dose(g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	8
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	8
川芎	Cnidii Rhizoma	8
生地黃	Rehmanniae Radix Recens	8
麥門冬	Liriopis Tuber	8
白何首烏	Cynanchi Wilfordii Radix	6
甘草	Glycyrrhizae Radix	6
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	6
牛蒡子	Arctii Fructus	4
白蒺藜	Tribuli Fructus	4
大棗	Jujubae Fructus	4
金銀花	Ronicerae Flos	4
五味子	Schizandrae Fructus	4
薏苡仁	Coicis Semen	4
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	4
肉桂	Cinnamomi Cortex	4
馬齒莧	Portulacea Herba	4
枳實	Aurantii immaturus Fructus	4
連翹	Forsythiae Fructus	3
柴胡	Bupleuri Radix	3
白芷	Angelicae dahuricae Radix	3
地骨皮	Lycii Radicis Cortex	3
山楂	Crataegi Fructus	2
黃連	Coptidis Rhizoma	2
神麴	Massa medicata Fermentata	2
薄荷	Menthae Herba	2
荊芥	Schizonepetae Herba	2
	Total	120

2. 방법

1) 시료 추출 방법

가감당귀음자 2첩(240 g)을 증류수로 씻은 뒤 3 L의 증류수를 넣고 전기약탕기(DW-790, 대웅바이오가전, 한국)로 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 진공회전농축기(NE-1001, Eylea, Japan)로 200 ㎖가 되도록 감압농축한 후 -80℃에서 동결시켰다. 이를 다시 동결건조기(Labconco, USA)을 이용하여 7일 간 동결건조 시킨 후 58.9 g의 분말을 얻었다. 가감당귀음자의 수득율은 23.75%로 -20℃에 보관하였다가 실험 직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 μm 실린지 필터(Millipore, Ireland)로 여과 후 실험에 사용하였다.

2) 가감당귀음자의 항산화능력 측정 실험

(1) DPPH radical assay

Brand-Williams 등의 실험방법[23]을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 가감당귀

음자의 소거능력을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도의 가감당귀음자 열수추출물 500 ㎕를 1.5 ㎖ tube에 넣고 0.3 mM DPPH 용액을 500 ㎕ 가하여 10초 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20분 동안 반응시킨 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 525 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 [(흡광도시료무첨가 - 흡광도시료) / 흡광도시료무첨가] × 100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 1 ㎍/㎖ vitamin C를 사용하였다.

(2) Hydroxyl radical assay

Chung 등의 실험방법[24]을 변형하여 hydroxyl radical에 대한 가감당귀음자의 소거능력을 측정하였다. 50 ㎕의 10 mM $FeSO_4$와 50 ㎕의 10 mM H_2O_2를 이용한 Fenton 반응으로 hydroxyl radical를 발생시켰다. 발생된 radical을 25 ㎕의 10 mM EDTA, 25 ㎕의 10 mM 2-deoxyribose, 150 ㎕의 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)의 존재하에서 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도의 가감당귀음자 열수추출물과 반응시킨 다음 37℃에서 4 시간 동안 반응시켰다. 여기에 250 ㎕의 2.8% TCA 용액 및 250 ㎕의 1% TBA 용액을 첨가한 후에 100℃로 가열하였다. 그 후 상온에서 식힌 다음 1000 × g에서 5분 동안 원심분리 하였다. 회수한 상등액은 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 532 ㎚에서 흡광도를 측정 하였으며 항산화 활성은 [(흡광도시료무첨가 - 흡광도시료) / 흡광도시료무첨가] × 100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 10 ㎍/㎖ vitamin E를 사용하였다.

(3) Hydrogen peroxide scavenging assay

Choi 등의 실험방법[25]을 변형하여 hydrogen peroxide에 대한 가감당귀음자의 소거활성을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도의 가감당귀음자 열수추출물 각 80 ㎕를 20 ㎕의 10 mM hydrogen peroxide 및 100 ㎕의 0.01 M 인산완충용액(pH 5.0)과 37℃에서 5분 동안 반응시켰다. 그 후, 15 ㎕의 1.25 mM ABTS 및 30 ㎕의 peroxidase를 37℃에서 10분 동안 반응시켜 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 ㎚에서 흡광도를 측정하였으며 항산화 활성은 [(흡광도시료무첨가 - 흡광도시료) / 흡광도시료무첨가] × 100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 200 ㎍/㎖ vitamin C를 사용하였다.

(4) Superoxide radical scavenging assay

Liu 등의 실험방법[26]에 따라 superoxide radical에 대한 가감당귀음자의 소거활성을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도의 시료 각 20 ㎕에 62 uM nitro blue tetrazolium(NBT)와 98 μM β-nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)를 함유한 20 mM Tris 용액(pH 8.0) 800 ㎕를 혼합한 다음, 20 mM Tris 용액 80 ㎕와 33 μM phenazine methosulfate(PMS) 100 ㎕를 각각 첨가하였다. 비효소적 PMS / NADH로 유발된 수퍼옥사이드 음이온에 의해 자주색의 formazan으로 환원된 NBT를 측정하기 위해 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 560 ㎚에서 10분 동안 반응물의 흡광도를 측정하였다. 시료의 superoxide radical scavenging activity는 [(흡광도시료무첨가 - 흡광도시료) / 흡광도시료무첨가] × 100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 10 mU superoxide dismutase(SOD)를 사용하였다.

(5) Lipid peroxidation assay

Shlafer 등의 실험방법[27]을 변형하여 lipid peroxidation에 대한 가감당귀음자의 항산화 효과를 측정하였다. 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도의 가감당귀음자 열수추출물 2 ㎕를 linolenic acid emulsion 98 ㎕와 혼합한 후에 0.8 mM H_2O_2 50 ㎕와 0.8 mM $FeSO_4$ 50 ㎕를 혼합하여 hydroxyl radical을 발생시킨 용액과 5시간 동안 반응 후 0.4% 2-thiobarbituric acid(TBA)를 200㎕ 첨가하고 95℃에서 2시간 반응시킨 다음 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 다음 15 : 1 비율의 n-butanol : pyridine 용액을 500 ㎕ 첨가하고 1000 × g에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 532 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화 정도는 [(흡광도시료무첨가 - 흡광도시료) / 흡광도시료무첨가] × 100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 10 ㎍/㎖ vitamin E를 사용하였다.

(6) Reducing power assay

Oyaizu의 방법[28]에 따라 가감당귀음자의 환원력을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도의 가감당귀음자 열수추출물 1 ㎖에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ㎖씩 차례로 가하여 교반한 후 50℃의 수욕상에서 20분 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액을 1 ㎖ 가하여 13500 × g에서 15분 동안 원심분리 하고 상등액 1 ㎖에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ㎖를 혼합한 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 700 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 reducing power는 [(흡광도시료무첨가 - 흡광도시료) / 흡광도시료무첨가] × 100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 10 ㎍/㎖ vitamin C를 사용하였다.

3) 가감당귀음자의 세포독성 실험

가감당귀음자 열수추출물이 HaCaT 세포주의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 96 well plate에 2 X 10^4 cell/well이 되도록 세포주를 분주하고 37℃, 5% CO_2가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 여기에 가감당귀음자 열수추출물을 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도로 처리하고 24시간 동안 추가 배양 후 MTT 수용액을 최종농도 1 ㎎/㎖가 되도록 배지에 넣고 1시간 30분 동안 37℃, 5% CO_2가 공급되는 조건에서 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 DMSO 용액을 각 well 당 200 ㎕ 넣은 뒤 30분 정도 쉐이커에 올려놓아 석출되게 한 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정하였다. 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다.

4) UVB로 유도된 세포사멸 억제 실험

(1) MTT assay

6 well plate에 1 X 10^5 cell/well이 되도록 세포주를 분주하고 37℃, 5% CO_2가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. PBS로 3회 세척 후 5개의 UVB 램프(G8T5E, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 40 mJ/㎠ 세기로 UVB를 조사하여 세포사멸을 유도하였다. 이후 FBS가 포함된 DMEM에 가감당귀음자 열수추출물을 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도로 처리하고 48

시간 동안 추가 배양 후 MTT 수용액을 최종농도 1 ㎎/㎖ 가 되도록 배지에 넣고 1시간 30분 동안 암소에서 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 DMSO 용액을 각 well 당 1 ㎖씩 넣은 뒤 30분 정도 쉐이커에 올려놓아 용해되게 한 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정하였다.

(2) Hoechst 33342 staining

HaCaT 세포주를 6 well plate에 2 X 10^5 cell/well이 되도록 접종하고 37℃, 5% CO_2가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. PBS로 3회 세척 후 5개의 UVB 램프(G8T5E, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 40 mJ/㎠ 세기로 UVB를 조사하였다. 이후 0 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖ 농도의 가감당귀음자 열수추출물이 포함된 DMEM 배지를 각각 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 세포의 핵을 염색하기 위하여 배지의 상층액을 제거한 후 차가운 DPBS로 3회 세척하고 4% paraformaldehyde로 상온에서 30분간 처리하여 세포를 고정하였다. 다시 DPBS로 3회 세척 후 Hoechst 33342를 DPBS에 녹인 1 ㎍/㎖ 수용액으로 15분간 염색하고 형광현미경(EVOS fl, AMG, USA)을 이용하여 apoptotic body를 관찰하였다.

5) UVB로 유도된 활성산소종(ROS) 생성 억제 실험

HaCaT 세포주를 6 well plate에 2 X 10^5 cell/well이 되도록 접종하고 37℃, 5% CO_2가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. PBS로 3회 세척 후 5개의 UVB 램프(G8T5E, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 40 mJ/㎠ 세기로 UVB를 조사하였다. 이후 0 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖ 농도의 가감당귀음자 열수추출물이 포함된 DMEM 배지를 각각 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 10 uM DCFH-DA가 첨가된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO_2가 공급되는 조건에서 60분간 배양한 후 PBS로 3회 세척 후 형광현미경(EVOS fl, AMG, USA)을 이용하여 관찰하였다.

결 과

1. 가감당귀음자의 항산화능력

1) DPPH radical scavenging effect

DPPH radical에 대한 가감당귀음자의 항산화 효과를 확인하기 위하여 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖의 농도로 처리한 결과 DPPH radical 소거능은 12.24%, 22.47%, 39.52%, 72.14%로 농도 의존적으로 증가됨을 관찰 할 수 있었다. 항산화 효과가 있는 것으로 알려진 vitamin C를 양성 대조군으로 사용한 결과 1 ㎍/㎖에서 44.12%의 DPPH radical 소거능을 보였다(Fig. 1A).

2) Hydroxyl radical scavenging effect

Fenton 반응으로 발생된 hydroxyl radical에 가감당귀음자를 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖의 농도로 처리한 결과 hydroxyl radical 소거능은 13.16%, 16.35%, 18.83%, 25.17%로 나타나 농도 의존적으로 유의성 있게 증가함을 관찰할 수 있었다. 항산화 효과가 있는 것으로 알려진 vitamin E를 양성 대조군으로 사용한 결과 10 ㎍/㎖에서 85.38%의 hydroxyl radical 소거능을 보였다(Fig. 1B).

3) Hydrogen peroxide scavenging effect

Hydrogen peroxide에 대한 가감당귀음자의 항산화 효과를 확인하기 위하여 농도별로 처리한 결과, 50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도에서 각각 7.39%, 7.62%, 22.4%의 유의성 있는 소거능을 나타내었으며 200 ㎍/㎖의 농도에서 17.06%의 소거능을 보여준 vitamin C와 유사한 항산화 능력을 확인할 수 있었다(Fig. 1C).

4) Superoxide radical scavenging effect

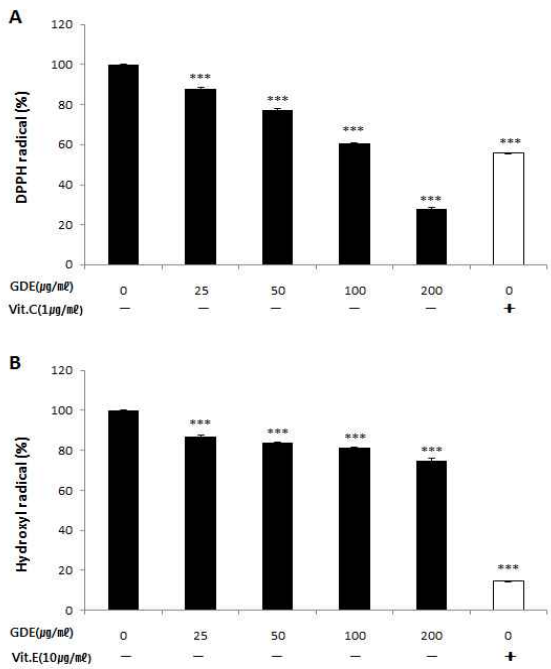
Superoxide radical에 대한 가감당귀음자의 항산화 효과를 확인하기 위하여 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖의 농도로 처리한 결과 6.27%, 21.65%, 40.28%, 58.58%의 superoxide radical 소거능을 확인할 수 있었다. superoxide radical 소거능이 뛰어난 것으로 알려진 superoxide dismutase(SOD) 100 mU를 양성 대조군으로 사용한 결과 78.63%의 소거능을 확인할 수 있었다(Fig. 1D).

5) Lipid peroxidation inhibiting effect

Lipid peroxidation에 대한 가감당귀음자의 항산화 효과를 조사하기 위하여 linolenic acid를 Fenton반응으로 발생시킨 hydroxyl radical에 노출시키고 가감당귀음자를 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖의 농도로 처리한 결과 16.67%, 17.11%, 18.32%, 20.89%로 전 농도에서 유의성 있는 지질과산화 억제효과를 관찰할 수 있었다. 친유성 항산화제인 vitamin E 10 ㎍/㎖을 양성대조군으로 사용한 결과 53.59%의 지질과산화 억제효과가 확인되었다(Fig. 1E).

6) Reducing power increasing effect

가감당귀음자의 환원력을 확인하기 위하여 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖의 농도로 처리한 결과 42.46%, 74.71%, 144.08%, 260.02%의 환원력을 관찰 할 수 있었다. 양성 대조군으로 항산화 효능이 잘 알려진 vitamin C(10 ㎍/㎖)를 사용한 결과 510%의 환원력을 확인할 수 있었다(Fig. 1F).



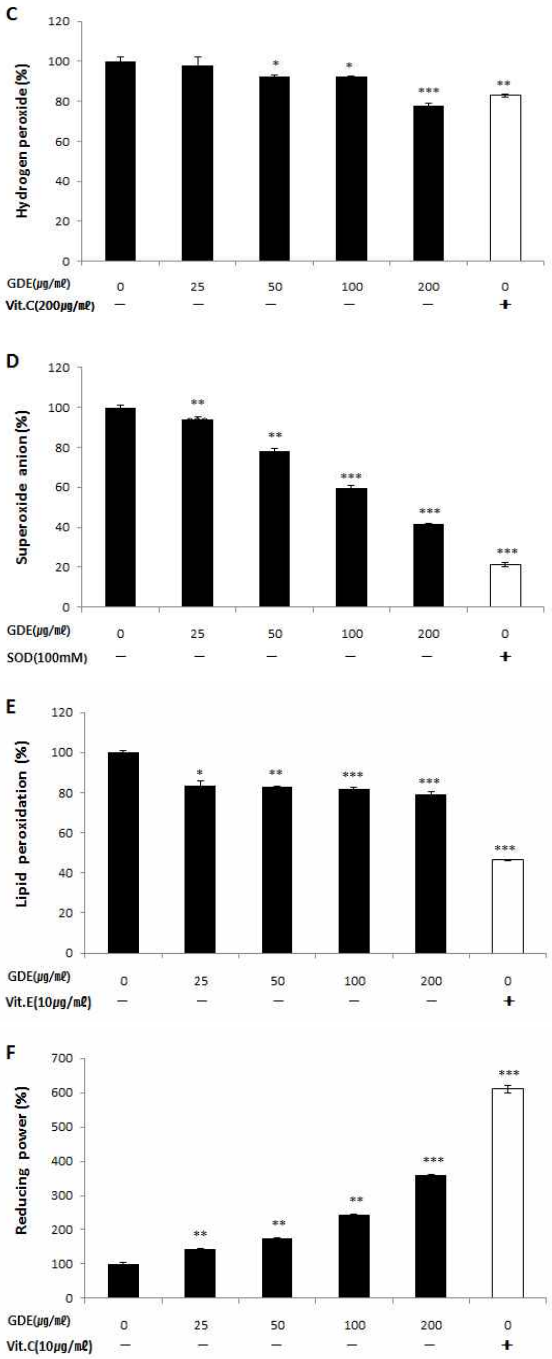


Fig. 1. Scavenging activities of GDE on DPPH radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide anion, lipid peroxidation and reducing power of GDE. DPPH radical(A), hydroxyl radical by Fenton reaction (B), hydrogen peroxide (C), superoxide anion (D), lipid peroxidation (E) and reducing power (F) was evaluated in the presence of GDE. After GDE at the indicated concentrations was reacted with each radical, the optical density of each reaction mixture was measured at a specific wavelength with spectrophotometer. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001) using Student's t test.

2. 가감당귀음자의 세포독성 실험

가감당귀음자가 HaCaT 세포주의 생존율에 미치는 영향을 확인하고자 MTT assay를 실시하였다. 대조군의 평균 흡광도를 100으로 환산한 뒤 각 흡광도 값을 계산한 결과, 모든 농도에서 가감당귀음자 처리군은 대조군과 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 따라서 가감당귀음자는 200 μg/mℓ 이하의 농도에서 세포 생존율과 증식을 저해하지 않는 것으로 확인되었다.

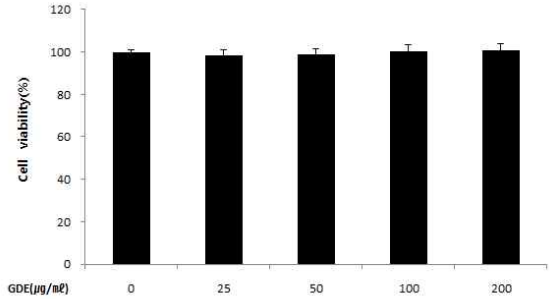


Fig. 2. Effects of GDE on the HaCaT cell viability. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test.

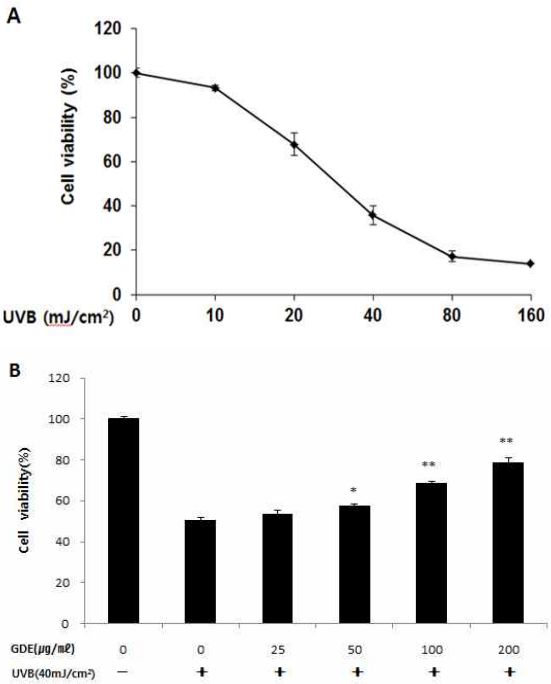


Fig. 3. Effect of UVB and GDE on HaCaT cells viability. (A) Effect of various doses of UVB on cell viability. Cells were radiated with different doses of UVB and then incubated for 48 h. (B) Effect of GDE under UVB irradiation on cell viability. Cells were radiated with 40 mJ/㎡ of UVB and then incubated with different doses of GDE for 48 h. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (* P < 0.05, ** P < 0.01) using Student's t test.

3. UVB로 유도된 세포사멸에 대한 가감당귀음자의 손상 회복 효과

UVB가 세포사멸을 유도하는지를 확인하고, 실험에 적절한 세포사멸을 유도하는 UVB 조사량을 결정하기 위하여 HaCaT 세포주에 0, 20, 40, 80, 160 mJ/㎠로 UVB를 조사한 결과 40 mJ/㎠을 조사하였을 때 세포의 약 50%가 사멸하였으며, 160 mJ/㎠을 조사하였을 때 세포가 모두 사멸한 것을 확인하였다(Fig. 3A). 따라서

최종 실험에 사용될 조사량은 LD50(lethal dose for 50 percent kill)에 해당하는 40 mJ/㎠으로 결정하였다. UVB 손상에 대한 가감당귀음자 열수추출물의 회복력을 확인하기 위하여 세포에 UVB를 40 mJ/㎠로 조사한 후 가감당귀음자 열수추출물을 0, 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖로 처리한 결과 50, 100, 200 ㎍/㎖에서 손상 회복에 의한 생존율이 증가하였다(Fig. 3B). UVB로 유도된 세포사멸에서 나타나는 핵의 응축 현상인 apoptotic body를 Hoechst 33342로 염색하여 형광현미경에서 관찰한 결과, UVB 조사만 시행한 군에서는 apoptotic body(화살표)가 현저하게 증가하였으며, UVB 조사 후 가감당귀음자를 처리한 군에서는 apoptotic body 생성이 감소되었음을 확인하였다(Fig. 4). 따라서 가감당귀음자는 UVB로 유도된 세포손상에 대하여 회복 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

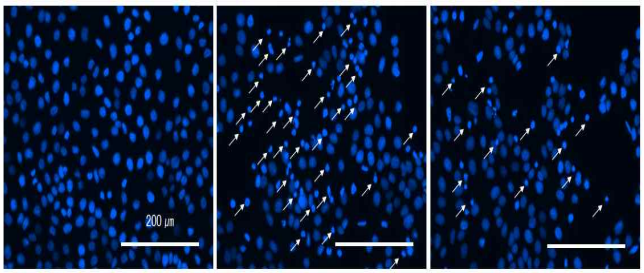


Fig. 4. UVB-induced apoptotic body in HaCaT cells. The cells treated only UVB (40 mJ/㎠) or with GDE (200 ㎍/㎖) were stained with Hoechst 33342.

4. 가감당귀음자의 세포내 활성산소종(ROS) 생성 억제효과

UVB 조사로 증가된 세포내 ROS에 대한 가감당귀음자의 영향을 관찰하기 위하여 DCFH-DA assay를 시행한 결과, UVB의 자극은 세포 내 ROS의 생성을 현저히 증가시켰으며, 이러한 ROS의 생성은 가감당귀음자 처리에 의하여 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

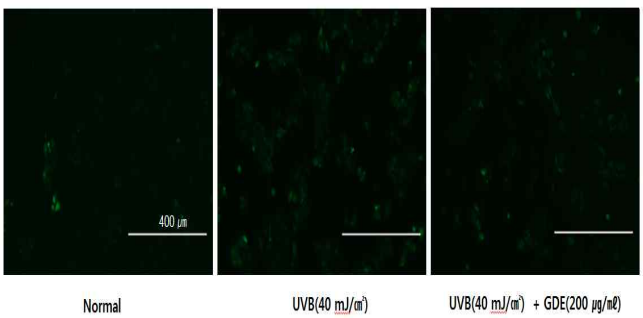


Fig. 5. UVB-induced intracellular oxidant generation in HaCaT cells. The cells treated only UVB (40 mJ/㎠) or with GDE (200 ㎍/㎖) were stained with DCFH-DA.

고 찰

피부는 외부 요인에 의한 질병뿐만 아니라 인체의 각종 내재 요인에 의해 영향을 받는 부위로서 피부의 노화 또한 인체 노화의 원인을 따른다[29]. 한의학적 관점에서 노화는 先天稟賦不足과 後天攝生失調로 발생한다고 하여 精血의 虧虛을 老化의 가장 큰 원인으로 지목하고 있다. 精은 생명체의 기본 요소로, 水穀이 胃에 들어가 소화·흡수·氣化作用을 거쳐 생성된 精은 腎臟에 저장되는데, 이러한 精은 다른 臟腑의 필요시 공급되어지는 생명활동의 필수불가결한 영양물질이다. 血은 五臟의 종합적인 작용에 의하여 생성되어 인체의 皮毛, 骨肉 및 臟腑를 榮養·滋潤하여, 정상적 생리활동을 유지하는 물질이다. 따라서 精血이 충만하면 五臟六腑가 충실하게 되어 氣의 운행 또한 활발해지므로 病邪를 방지하고 노화를 지연시키게 되는 것이다. 그러나 精血이 부족해지면 血液의 흐름이 저하되어 氣의 鬱滯와 瘀血이 생성되어 五臟六腑와 조직이 자양되지 못하므로 臟腑, 骨肉, 九竅 및 피부의 노화가 진행되면서, 인체의 질병 예방능력과 자연회복력이 떨어진다[30]. 『黃帝內經』을 토대로 노화를 분석한 연구에서도, 노화는 陰精의 소모와 동시에 진행되는 것으로 보았다[31]. 이와 같이 노화로 인한 다양한 변화의 근본은 精血로서, 가령에 따라 精血이 부단히 소모되어 노화가 발생하는 것이다. 피부 노화의 원인도 이러한 인체 노화의 원인과 동일하므로 精血의 虧虛로 인한 노화가 결국 피부 노화를 일으키는 근본 원인이 될 것이다. 따라서 補陰補血 효능을 지닌 한방처방을 기본으로 피부 생리 활성 효능이 있는 한약재들을 가감한다면 안전하면서도 우수한 피부 항노화 효과를 지닌 한방피부미용 소재로의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

당귀음자는 嚴의 『濟生方』[11]에 처음 수록된 처방으로 補血하는 사물탕을 기본방으로 하여 補肝腎하는 하수오, 風熱을 제거하여 피부소양증과 瘡을 치료하는 백질려, 風熱을 발산시키는 형개, 방풍, 托瘡生肌하는 황기, 諸藥을 조화시키고 해독작용을 하는 감초[32-34]를 가하여 “治心血凝滯, 內蘊風熱, 發見皮膚, 遍身瘡疥”의 목적으로 입방되었으며 血燥 및 風熱로 인한 피부 소양증, 부스럼, 만성 두드러기 등의 피부질환에 응용되고 있다[12]. 당귀음자에 대한 연구로는 건선에 활용되는 가미당귀음자에 대한 실험[14] 및 임상적 고찰[15,16], 당귀음자 수추출액이 항알러지 반응과 마우스의 면역세포기능에 미치는 영향[17], 가미당귀음자[18], 당귀음자가감방[19] 단독사용 또는 외치방 병용[20,21]이 아토피 동물 모델에 미치는 영향, 열·피부발진·소양감·림프절종대 등을 특징으로 하는 항경련제 과민성 증후군 치험례[22], 가미당귀음자의 항염증 효과[23] 등이 있다.

가감당귀음자(Gagam-Danguieumja, GDE)[13]는 당귀음자에 淸熱解毒, 發散風熱, 補陰益氣, 行氣燥濕, 溫補脾胃하는 수종의 약재를 가하여 陰血損傷, 脾虛氣血不調로 전변되는 만성 피부 질환에 사용하기 위하여 작방된 처방이다. 이 처방은 항염증 효과[23]가 있는 것으로 확인되었으며 임상에서 아토피성 피부염을 비롯한 만성 피부 질환에 다용되고 있으나, 항산화능력 및 광노화와 연관된 연구는 아직까지 진행된 바가 없는 실정이다.

피부는 개개인의 인체의 노화 정도를 판단하는 주요 지표가 된다. 피부는 인체의 최외곽에 위치하여 항상 외부 환경에 노출되어 있으므로 노화에 따른 피부변화는 많은 부분이 외부인자들의 영향에 의한 것이라고 할 수 있는데 특히 자외선과 호흡을 통해 생성되는 활성산소가 피부노화의 가장 중요한 원인으로 간주되고 있다[35].

활성산소는 정상적인 대사과정에서 생성되지만, 질병·스트레스·흡연·공해·세균감염 및 자외선 조사시에도 과량으로 발생된다. 특

히, 피부는 외부에 노출되어 있어 자외선으로 인한 활성산소 생성 반응이 지속적으로 유도되는 부위이다[36].

활성산소는 피부의 항산화 방어망을 파괴함으로써 피부의 세포 및 조직 손상을 주도한다. 활성산소로 인한 지속적 산화 스트레스는 세포 간질의 구성 성분을 파괴시키는 단백질 분해효소를 활성화시킬 뿐 아니라, 탄력섬유와 교원섬유 사슬을 절단하거나 비정상적인 교차결합을 촉진하고, 히아루론산 사슬의 절단, 지질 과산화, 단백질 산화, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화 등 생체 구성 성분들의 손상을 초래한다[37,38]. 또한 피부 염증 반응을 유도하고, 피부 면역 체계를 억제시켜 세균 감염 또는 피부암 발생을 증가시킨다. 이러한 반응으로 인하여 피부의 탄력감소·주름·기미·주근깨 등을 특징으로 하는 피부노화가 가속화된다[39].

따라서 본 연구에서는 가감당귀음자의 항산화능력을 확인하고, 사람각질형성세포에서 가감당귀음자가 자외선으로 유도된 세포사멸을 억제하는지 여부 및 사람각질형성세포에서 자외선 조사로 활성화되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 미치는 영향을 규명함으로써 자외선으로 유도된 피부노화에 대한 가감당귀음자의 보호효과 및 그 기전을 확인하고자 하였다.

1,1-diphenyl-2-pycrylhydrazyl(DPPH)는 안정한 유리기로 cysteine, glutathion과 같은 황 함유 아미노산과 ascorbicacid, aromatic amine(ρ-phenylenediamine, ρ-aminophenol) 등에 의해 환원되어 자색이 탈색되므로 다양한 천연소재에서 항산화물질을 검출하는데 다용되고 있다[23]. 가감당귀음자는 25 ㎍/㎖의 농도에서부터 대조군과 비교하여 유의성 있는 DPPH radical 소거능을 보였으며 농도 의존적으로 효과가 증대되었다.

Hydroxyl radical은 구리, 철 이온 등의 금속이온과 반응하여 독성이 강한 free radical을 생성하는데 DNA 손상 및 돌연변이 유발로 인해 문제시 되고 있다[37]. 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖의 농도로 가감당귀음자를 처리한 후 hydroxyl radical 소거능을 측정한 결과, 농도 의존적 소거능 증가가 관찰되었다.

Hydrogen peroxide는 활성산소를 쉽게 생성하여 ROS에 포함되는데, 그 자체의 독성은 낮으나 세포막을 통과하고 Fe^{2+} 등과 같은 금속이온과 반응하여 독성이 강한 hydroxyl radical을 생성하기 때문에 생체나 식품에서 문제시 되고 있다[38-40]. 가감당귀음자는 50 ㎍/㎖ 이상의 농도에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 소거능을 나타내었으며 200 ㎍/㎖ 농도에서 vitamin C(17.06%)와 유사한 소거능(22.4%)을 보였다.

Superoxide radical은 ROS 중 대표적인 산소라디칼로 dismutation 반응 후 hydrogen peroxide로 인하여 hydroxyl radical로 전환되는데, hydroxyl radical은 반응성이 커서 생체 내 거대분자를 손상시키고 산화형 철인 Fe^{3+}를 환원형 철인 Fe^{2+}로 환원시켜 fenton 반응을 유도하며, 단백질 구조를 직접 변형시켜 효소 불활성화를 초래하므로 superoxide radical 또한 인체 내 산화 및 발암과 밀접한 관계를 갖고 있다[41-43]. 본 실험에서 xanthine과 xanthine oxidase에 의해 생성되는 superoxide radical에 대한 가감당귀음자의 소거능을 평가한 결과 농도 의존적 소거능 증가를 확인할 수 있었다.

Lipid peroxide(LPO)는 독성물질에 의한 세포막 지질성분의 산화반응 촉진으로 생성되는 산물로써 생체 내에서 생화학적 조직 손상의 척도 및 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로 널리 활용되고 있다[44]. 본 연구에서는 지질 과산화에 대한 가감당귀음자의 항산화 효과를 조사하기 위하여 linolenic acid를 Fenton 반응으로 발생시킨 hydroxyl radical에 노출시킨 후 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖의 농도로 가감당귀음자를 처리한 결과 25 ㎍/㎖ 농도에서부터 대조군과 비교하여 유의성 있는 지질과산화 억제 효과를 나타내었다.

환원력은 항산화 과정에서 중요한 요소로서 항산화제로부터 제공되는 수소원자가 free radical과 반응[28]하는 능력을 의미한다. 가감당귀음자의 환원력을 확인하기 위하여 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖의 농도로 처리한 결과 농도 의존적으로 환원력이 증가됨을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때 가감당귀음자는 다양한 활성산소종을 억제하는 항산화능력을 지니고 있으므로 저활성 및 용도의 한계성 등으로 사용에 제한을 받는 기존 항산화제들[42]의 문제점을 보완할 수 있는 한방처방으로써 피부를 비롯한 생체의 노화를 방지하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

서양의학적 관점에서 피부노화는 내인성 요인과 외인성 요인으로 그 원인을 나눌 수 있다[45]. 피부노화의 내인성 요인은 주로 유전적인 요인으로 피부 세포 및 조직의 구조 및 변화를 결정한다[47]. 피부노화의 외인성 요인은 흡연, 과도한 음주 섭취, 영양부족, 만성적인 태양광선 노출 등 예방이 가능한 요인으로 이중 태양광선은 안면부 피부노화에 80% 이상의 비중을 차지하는 것으로 알려져 있다[48].

태양광선을 파장에 따라 분류하면 자외선, 적외선, 가시광선으로 나뉘는데, 200-400 ㎚ 파장의 자외선은 인간의 피부에 광생물학적 반응을 유발하여 광노화를 초래하는 중요한 광선이다[3]. 자외선에 의한 손상은 자외선에 의해서 생겨나는 과도한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 때문에 일어나는 것으로 세포 내 단백질, 지질 등을 산화시켜서 정상적인 생리 활성을 저해하고 세포사멸에 이르게 하는 것으로 알려져 있다[49]. 특히 세포사멸이 촉진되면 생체 내 여러 기관의 생리적 기능을 퇴화시킬 뿐 아니라 노화를 가속화 시키게 된다[50].

본 실험에서 사람각질형성세포인 HaCaT 세포주에 대한 UVB의 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 시행하여 세포 생존율을 측정한 결과 세포사멸 비율이 UVB 조사량에 비례하여 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 가감당귀음자를 처리한 경우, 세포사멸 비율이 가감당귀음자의 각 농도에 비례하여 현저하게 감소하였으며 Hoechst 33342 염색 후 형광 현미경 관찰을 통해서도 가감당귀음자가 세포사멸로 인한 apototic body 형성을 억제함을 확인할 수 있었다.

UVB로 유도된 세포사멸을 초래하는 ROS의 활성에 대한 가감당귀음자의 효과를 확인하고자 DCFH-DA assay를 시행하여 세포 내 ROS 변화를 측정 하였다. 형광표지자인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 세포막을 쉽게 통과하여 세포 내에 확산된 후 세포 내의 에스테라아제에 의해 2',7'-dichlorohydrofluorescein(DCFH)로 가수분해 되면서 형광이 소실되는데, ROS가 존재하는 환경에서는

2',7'-dichlorofluorescein(DCF)로 빠르게 산화되면서 고형광을 발생한다[2]. UVB 조사를 통해 ROS를 유도한 후 200 ㎍/㎖의 가감당귀음자를 처리한 결과, 대조군의 ROS 생성량에 비하여 감소된 것을 확인함으로써 가감당귀음자가 ROS 생성을 억제하여 세포내 산화적 스트레스를 감소시켜 줌으로써 세포사멸을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

본 연구를 통해 가감당귀음자가 항산화능력을 바탕으로 UVB에 의한 ROS의 생성으로 유발된 세포사멸을 억제함으로써 자외선으로 인한 피부손상 보호효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 추후 항산화 효과가 우수한 식물종에 대해 단일 물질에 대한 분리 작업과 함께 항주름, 미백 효과에 대한 실험이 더 깊이 있게 진행된다면 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질로서 효과적이면서도 안전한 화장품 소재로의 활용 또한 가능할 것으로 기대된다.

결 론

본 연구에서는 가감당귀음자의 항산화 효과 및 자외선으로 유도된 각질형성세포 손상에 대한 보호효과를 확인하고자 생체 내 산화적 스트레스를 유발하는 DPPH radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide radical, lipid peroxidation에 대한 가감당귀음자 열수추출물의 소거 효과 및 환원력 평가와 사람 각질형성세포주인 HaCaT cell에서 UVB로 유도된 세포사멸과 ROS 생성에 대한 가감당귀음자의 작용을 평가하는 실험을 진행하였다. 그 결과, 가감당귀음자는 다양한 활성산소종에 대한 항산화 효능이 있으며 세포내에서 UVB로 유도된 세포사멸의 발현을 억제하며 이는 가감당귀음자의 ROS 생성 억제 효과와 관련이 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

References

1. Wulf, H.C., Moller, J.S., Kobayasi, T., Gniadecki R. Skin aging and natural photoprotection. Micron 35: 185-191, 2004.
2. Jeon, H.S., Lee, C.H., Ahn, H.S. Experimental Studies on the Inhibitory Effects of Yukmijiwhang-tang on Photoaging Skin Induced by UVB Irradiation. J Physiol & Pathol Korean Med 28(5):520-529, 2014.
3. Berneburg, M., Plettenberg, H., Krutmann, J. Photoaging of human skin. Photodermatol Photoimmunol Photomed 16: 239-244, 2000.
4. Fuchs, J., Packer, L. Photooxidative stress in the skin. H. Sies (Ed.), Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. London, Academic Press, pp 559-583, 1991.
5. Sies, H. Biochemistry of Oxidative Stress. Angewandte Chem 25(12):1058-1071, 1986.
6. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology 82(2):291-295, 1997.
7. Brenneisen, P., Sies, H., Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. Ann N Y Acad Sci 973: 31-43, 2002.
8. Heck, D.E., Gerecke, D.R., Vetrano, A.M., Laskin, J.D. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. Toxicol. Appl. Pharmacol. 195: 288-297, 2004.
9. Pugliese, P.T. The skin, free radicals, and oxidative stress. Dermatol Nurs 7: 361-369, 1995.
10. Kulms, D., Poppelmann, B., Yarosh, D., Luger, T.A., Krutmann, J., Schwarz, T. Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. Proc Natl Acad Sci 96(14):7974-7979, 1999.
11. Um, Y.H., Fang, J.S. Seoul. YeoGang publisher. p 522, 1987.
12. Cha, K.b., Kim, Y.s., Seol, I.c. Literatual study on Atopic dermatitis. Journal of the Institute of Oriental Medicine, Daejeon University 14(2):113-126, 2005.
13. Jecheon Korean Medicine Hospital of Semyung University. Collection of Medical Prescriptions. Jecheon, Insung publisher. p 211, 2009.
14. Lee, K.H., Roh, S.S. Research of Experimental Kamidangkwieumja in Psoriasis. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology 19(2):113-142, 1999.
15. Shim, S.H., Kim, J.H., Choi, J.H., A Clinical study about the effect of Danguiumjagagam on a Psoriasis Patient. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology 5(1):336-342, 2002.
16. Min, D.L., Chang, S.J., Park, E.J. A Case Report of Treating Childhood Psoriasis by Danguieumja-gagambang and External Treatments. J Korean Oriental Pediatrics 26(3):20-29, 2012.
17. Roh, S.S., Lee, K.N. Effects of Dangkiyeumja Water Extract on the Anti-Allergic Responses and the Functions of Murine Immunocytes. The Journal of WonKwang Oriental Medicine 2(1):121-140, 1990.
18. Han, J.K., Kim, Y.H. Effect on Kami-Dangkueeumja (KDKEJ) in Atopic Dermatitis Animal Model. J Korean Oriental Pediatrics 19(1):35-52, 2005.

19. Han, K.H., Park, E.J., Lee, H.J. A Comparative Study of Regulatory Effect of Atopic Allergic Reaction by Prescriptions (A, B). J Korean Oriental Pediatrics 19(2):13-30, 2005.
20. Kim, S.H., Kim, J.H., Park, S.Y., Choi, J.H. Effect of Tang-gwi-eum-za-gagambang along with External Spray Therapy on the Spontaneously Occurring Atopic Dermatitis Development in NC/Nga Mouse. The Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology Society 18(1):27-49, 2005.
21. Song, S.P., Son, D.B., Hwang, C.H., Song, S.H., Hwang, C.Y. Effects of Danggwieumja Administration along with Samhwangseje-gamibang on NC/Nga Atopic Mice. J Physiol & Pathol Korean Med 21(5):1210-1218, 2007.
22. Kim, T.k., Ryu, S.H., Choi, Y.S., Kim, J.J., Chung, K.H., Kim, Y.S. The Effect of Dangkwieumja(Dangguiyinzi) on Anticonvulsant Hypersensitivity. Korean J Orient Int Med 23(2):268-273, 2002.
23. Kim, T.Y. Effect of Gagam-Danguieumja through Regulation of MAPK on LPS-Induced Inflammation in RAW 264.7 Cells Korean J Orient Int Med 34(4):339-348, 2013.
23. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci. Technol-Leb 28(1):25-30, 1995.
24.. Chung, S.K., Osawa, T., Kawakishi, S. Hydroxyl Radical-scavanging Effects of Spices and Scavengers from Brown Mustard (Brassica nigra). Biosci Biotech Biochem 61(1):118-123, 1997.
25. Choi, G.P., Dhung, B.H., Lee, D.I., Lee, H.Y., Lee, J.H., Kim, J.D. Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme from medicinal plants. Korean J Medicinal Crop Sci 10: 399-402, 2002.
26. Liu, F., Ooi, V.E.C., Chang, S.T. Free radical scavenging activities of mushroom olysaccharide extract. Life Sci 60: 763-771, 2007.
27. Shlafer, M., Shepard, B.M. A method to reduce interference by sucrose in the detection of thiobarbituric acid-reactive substances. Analytical biochemistry 137(2):269-276, 1984.
28. Oyaizu, M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nutr 44: 307-315, 1986.
29. Yuan Anhui zhong yi xue yuan bian. Zhong yi lin chuang shou ce. Seoul, Sungbo Publisher, pp 4-5, 1983.
30. Kim, J.M., Jeon, S.W., Lee, W.G., Nam, H.J., Kim, Y.B. Study of Preventing Methods for Skin Aging and Wrinkles. J Physiol & Pathol Korean Med 24(4):533-542, 2010.
31. Back, S.R. The Study on Aging. Journal of KyungHee Oriental Medicine College 22(1):107-118, 1999.
32. Lee, S.I. Herbal Formula in Schoolbook. Younglim Publisher, pp 171-172, 1990.
33. Lee, S.I., Ahn, D.K., Shin, M.H., Ro, S.H., Lee, Y.J., Kim, S.H. Medicinal Herbs Clinical Application. Seoul, Sungbo Publisher, pp 90-91, 107-108, 356-357, 433-436, 1983.
34. Professors of Herbology in College of Korean Medicine. Textbook of herbology. Seoul, Younglim Publisher, p 127, 131, 518, 534, 540, 583, 2002.
35. Hong, J.K. A Study on Skin Aging Caused by Free-Radical and on Efficacy of Antioxidant Vitamins. Korean journal of aesthetic society 7(2):51-62, 2009.
36. Mehlhon, R.J., Cole, G. The free radical theory of aging. Free radical biology & medicine 1: 165-223, 1985.
37. Bu, H.J., Lee, H.J., Yoo, E.S., Jung, D.S., Riu, K.Z., and Lee, S. Antioxdnat effects and inhibitory effect on NO synthesis by extracts of cansvalia lineate. Kor J Phar 35: 338-345, 2004.
38. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. London, Clarendon Press, pp 1-85, 1989.
39. Park, S.N. Skin aging and Antioxidants. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea 23(1):75-132, 1997.
40. Cho, T.Y. Free radical scavenging activity of tryptophan metabolites. M.S. Thesis, Yonsei University, 1999.
41. Lee, K.M. Protective effect of Ganoderma lucidum and Panax ginseng, C.A. Meyer on oxidative damage. M.S. Thesis, Seoul National University, 1997.
42. Namiki, M.O. Antioxidant/antimutagens in food. Critical Review in Food Science and Nutrition 29: 273-300, 1990.
43. Kang, K.H. Antioxidant and pro-oxidant activity of plant extracts. M.S. Thesis, Seoul National University, 1998.
44. Halliwell, B. Oxidants and human disease: some new concepts. Fase J 1: 258-364, 1987.
45. Choi, U., Shin, D.H., Chang, Y.S., Shin, J.I. Screening of Natural Antioxidant from Plant and Their Antioxidative Effect. Korean J Food Sci Technol 24: 142-148, 1992.
46. Baumann, L. Skin ageing and its treatment. Journal of Pathology 211: 241-251, 2007.
47. Nakamura, K., Izumiyama-Shimomura, N., Sawabe, M.,

Arai, T., Aoyagi, Y., Fujiwara, M., Tsuchiya, E., Kobayashi, Y., Kato, M., Oshimura, M., Sasajima, K., Nakachi, K., Takubo, K. Comparative analysis of telomere lengths and erosion with age in human epidermis and lingual epithelium, J invest Dermatol 119(5):1014-1019, 2002.

48. Uitto, J. Understanding, premature skin aging, N Engl J Med 337(20):1463-1465, 1997.

49 Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem J. 324: 1-18, 1997.

50. Chae, C.H. The effects of regular exercise and DL-α-Lipoic acid supplementation on Bax, Bcl-2 mRNA expression and apoptosis in induced aging rat heart. Korean journal of physical eduaction. 46(5):643-654, 2007.