

2007年2月

碩士學位論文

자외선에 의해 유도되는
Matrix Metalloproteinase 활성 및
발현에 대한 apigenin과
luteolin의 저해 효과

朝鮮大學校 大學院

藥學科

吳 教 女

자외선에 의해 유도되는
Matrix Metalloproteinase 활성 및
발현에 대한 apigenin과
luteolin의 저해 효과

(Protective effects of apigenin and luteolin on
ultraviolet A-induced Matrix Metalloproteinase
expression in human keratinocytes)

2007 年 2月 23日

朝鮮大學校 大學院

藥學科

吳 敎 女

자외선에 의해 유도되는
Matrix Metalloproteinase 활성 및
발현에 대한 apigenin과
luteolin의 저해 효과

指導教授 鄭 惠 光

이 論文을 藥學碩士學位 論文으로 提出함

2006 年 10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

藥 學 科

吳 教 女

吳教女の 碩士學位論文을 認准함

委員長 全南大學校 教授 李光烈 印

委 員 朝鮮大學校 教授 姜建旭 印

委 員 朝鮮大學校 教授 鄭惠光 印

2006 年 11月

朝鮮大學校 大學院

목 차

LIST OF FIGURES	iii
LIST OF ABBREVIATIONS	iv
ABSTRACT	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	6
II-1. 재료 및 시약	6
II-2. 세포배양, 시약 처리 및 UVA 조사	6
II-3. 세포독성 측정	7
II-4. 활성산소종 (ROS) 생성능 측정	7
II-5. MMP-1 및 -13 효소활성 측정	8
II-6. MMP-1 및 -13 유전자 발현 측정	8
II-7. 형질전환	9
II-8. c-Jun 및 c-Fos 유전자 발현 측정	10
II-9. c-Jun 및 c-Fos 단백질 발현 측정	10
II-10. MAP kinase 활성 측정	11
II-11. 통계학적 분석	12
III. 결과	15
III-1. Apigenin과 luteolin의 세포독성	15

III-2. 활성산소종 (ROS) 형성에 대한 영향	17
III-3. MMP-1 및 -13 효소 활성 저해	19
III-4. MMP-1 및 -13 유전자 발현 억제	22
III-5. AP-1 전사인자 활성화도	24
III-6. c-Jun 및 c-Fos 유전자 발현	26
III-7. c-Jun 및 c-Fos 단백질 발현	28
III-8. MAP kinases 활성화	30
IV. 고찰	33
V. 참고문헌	36
VI. 감사의 글	42

LIST OF TABLE AND FIGURES

TABLE

Table 1. PCR primer sequence	13
------------------------------------	----

FIGURES

Figure 1. Model depicting solar UV irradiation damage to skin connective tissue.	4
Figure 2. Structure of apigenin and luteolin.	5
Figure 3. Construction of the reporter gene plasmids.	14
Figure 4. Effects of apignin and luteolin on cell viability	16
Figure 5. Effects of apignin and luteolin on UVA-induced cellular ROS production in HaCaT cells	18
Figure 6. Effect of apigenin and luteolin on the type I collagenase activity	20
Figure 7. Effect of apigenin and luteolin on the type III collagenase activity	21
Figure 8. Effects of apigenin and luteolin on UVA-induced MMP-1 and MMP-13 mRNA expression	23
Figure 9. Effects of apigenin and luteolin on UVA-induced AP-1 promoter activity	25
Figure 10. Effects of apigenin and luteolin on UVA-induced c-Jun and c-Fos mRNA expression	27
Figure 11. Effects of apigenin and luteolin on UVA-induced c-Jun and c-Fos expression	29
Figure 12. Effects of apigenin on UVA-induced MAP kinase	

activity	31
Figure 13. Effects of luteolin on UVA-induced MAP kinase activity	32

List of Abbreviations

<i>AP-1</i>	Activator protein-1
<i>APMA</i>	4-aminophenylmercuric acetate
<i>DCF-DA</i>	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
<i>DMEM</i>	Dulbecco's modified Eagle medium : high glucos
<i>ECL solution</i>	Enhanced chemiluminescence
<i>ECM</i>	Extracellular matrix
<i>EMSA</i>	Electrophoretic mobility shift analysis
<i>FBS</i>	Fetal bovine serum
<i>MAP kinase</i>	Mitogen-activated protein kinase
<i>MMPs</i>	Matrix metalloproteinases
<i>MTT</i>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
<i>NAC</i>	N-acetyl cysteine
<i>PBS</i>	Phosphate-buffered saline
<i>PMSF</i>	Phenylmethanesulfonyl fluoride
<i>PVDF</i>	Polyvinylidene fluoride
<i>ROS</i>	Reactive oxygen species
<i>RT-PCR</i>	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
<i>UV</i>	Ultraviolet

ABSTRACT

자외선에 의해 유도되는 *Matrix Metalloproteinase* 활성 및 발현에 대한 *apigenin*과 *luteolin*의 저해 효과

Oh Kyo Nyeo

Advisor : Prof. Hye Gwang Jeong, Ph. D.
Department of Pharmacy,
Graduate School of Chosun University

Exposure of ultraviolet (UV) light for long term and repeated on the skin often induces chronic skin diseases such as skin cancer as well as photoaging, and the mechanisms of these skin damages are closely associated with up-regulation of collagenases activities. Moreover, UV-induced collagenases cause connective tissue damage and the skin to become wrinkled and aged. This study investigated the effect of apigenin and luteolin on the ultraviolet A (UVA)-induced matrix metalloproteinases (MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3)) expression in HaCaT human keratinocytes. Treatment with apigenin and luteolin decreased the UVA-induced generation of reactive oxygen species (ROS). In addition, apigenin and luteolin significantly suppressed the UVA-induced expression of MMP-1 and -13 mRNA. Moreover, transient transfection assay using activator protein-1 (AP-1)-linked luciferase reporter gene assay

revealed that apigenin and luteolin reduced UVA-induced AP-1 transcriptional activity. In this study investigated the effects of apigenin and luteolin on UVA-induced c-Jun and c-Fos expression in HaCaT cells. Apigenin and luteolin inhibited UVA-induced phosphorylation of c-Jun and expression of c-Fos. Treatment with apigenin and luteolin also inhibited ERK, JNK and p38 activation. These results suggested that apigenin and luteolin can inhibit UVA-induced MMP-1 and -13 expressions might be mediated through the AP-1 inactivation and inhibition of ROS formation in HaCaT cells. In conclusion, the results presented that apigenin and luteolin may be useful in the prevention of UVA-induced photoaging.

I. 서 론

일반적으로 피부노화란 주름의 증가, 피부의 처짐과 피부이완 등을 일컬으며, 시간의 흐름에 따라 나타나는 자연적인 노화와 장시간 일광에 노출되어 일어나는 인위적인 노화 등의 외부 환경에 의해서 피부노화가 진행 된다 (Fisher *et al.*, 2002; Jenkins, 2002). 자외선 A (UVA)와 자외선 B (UVB)의 노출에 의해 발생하는 피부노화는 자연적인 피부노화와는 달리 피부의 손상으로 간주되어 예방의 필요성이 요구되고 있다. 피부의 진피는 70%가 콜라겐(collagen)으로 이루어져 있고 연골의 50%와 뼈의 유기물 중 80%가 콜라겐으로 이루어져 있으며, 이러한 콜라겐 생합성은 나이가 들거나, UVA와 UVB에 노출되었을 때 생합성 효율이 낮아져 피부노화 및 피부손상이 촉진된다 (Shin *et al.*, 2005; Lateef *et al.*, 2004).

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 다형핵성 호중구, 대식세포, 치은섬유아세포, 골세포 등과 같은 세포로부터 분비되는 칼슘 및 아연 의존성 엔도펩티다제 (Endopeptidase)로 중성 pH에서 작용하는 효소이다. 이러한 MMPs는 조직의 형성, 암전이, 염증, 당뇨병, 피부노화 및 주름, 화상 및 상처 치료와 같은 병리학적 과정과 각종 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다. 구조적 유사성과 기질 특이성을 근거로 하여 MMPs는 collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane type-MMPs 그리고 알려지지 않은 MMPs 등으로 분류된다 (Mignatti and Rifkin, 1993). MMPs는 growth factors, cytokines, tumor promoters 및 ultraviolet (UV) 등과 같은 다양한 외부 자극인자에 의해서 과발현된다 (Fisher *et al.*, 2002). 또한 피부 섬유아세포에서 UV에 의해 유도된 MMPs의 다양한 발현은 collagen이나 다른 세포외기질(extracellular matrix: ECM)의 파괴를 유도하기 때문에 MMPs의 활성화는 피부 노화와 밀접한 관계를 가지고 있다 (Fisher and Voorhees, 1998). MMP-1은 type I collagenase이며, MMP-13은

type III collagenase로 UVA에 의해 활성화되어 콜라겐 분해에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Grimm *et al.*, 2004). MMP-1과 -13의 발현 조절은 AP-1 (activator protein-1) 전사인자의 활성화와 밀접한 관계가 있으며, AP-1의 활성화는 AP-1 복합체를 형성하는 c-Jun 및 c-Fos의 발현이 증가됨으로서 일어난다 (Chen *et al.*, 1998). AP-1 활성화의 증가는 MMP-1과 -13의 발현을 증가시켜 세포외기질 단백질의 콜라겐 분해 및 절단에 중요한 역할을 한다 (Bachelor *et al.*, 2005).

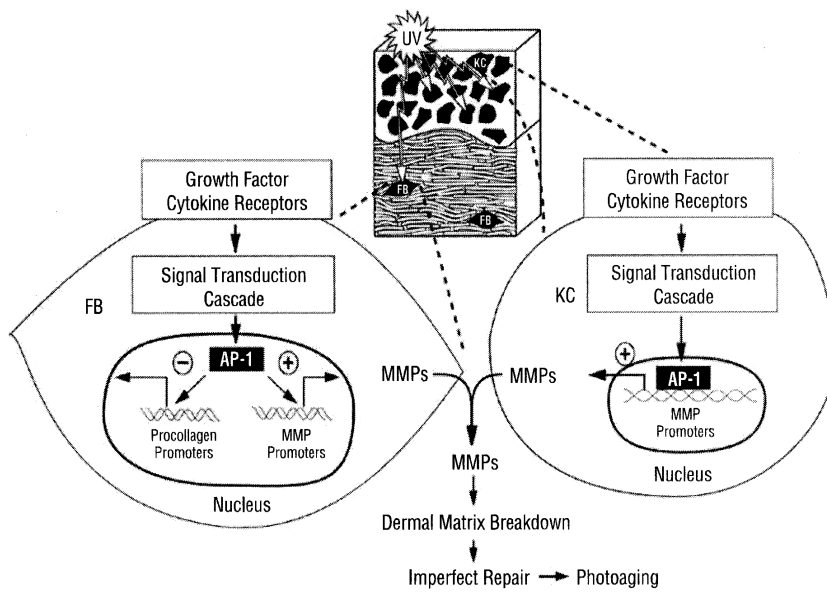
Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) 신호전달 과정은 MMP 발현을 포함하는 다양한 세포 기능을 조절하는 역할을 담당 한다 (Robinson and Cobb, 1997). 최근 연구 보고에 따르면 UV 조사 후 MAP kinase cascade와 같은 protein kinase cascades의 활성을 유도하는 growth factor 수용체들이 활성화되어 콜라겐 분해가 증가되는 것으로 알려져 있다 (Fisher *et al.*, 2002, Fig. 1).

활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 발생은 UV에 의해 유도되는 MAP kinase-mediated signal transduction에 결정적 역할을 하며, ROS가 발생되면 MMP-1의 발현이 증가되고, 이러한 ROS의 활성을 억제하는 물질들은 UV에 의해 유도되는 AP-1 활성화와 MMP-1, -13의 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있다 (Wenk *et al.*, 1999).

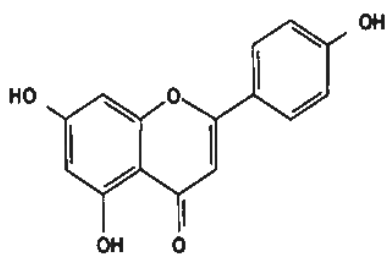
Apigenin과 luteolin은 그리스어로 황색을 의미하는 플라부스 (flavus)에서 유래된 말로 식물 색소를 의미하며, 식물의 잎·꽃·뿌리·열매·줄기 등에 많이 들어 있고 플라본 (flavone)을 기본 구조로 갖는 플라보노이드계 물질이다 (Chen *et al.*, 2004, Fig. 2). 플라보노이드는 페닐기 2개가 C3사슬을 매개하여 결합한 C6-C3-C6형 탄소골격구조로 되어 있으며, 이것이 여러 당류와 에테르 결합을 통해 배당체의 형태로 존재하는 경우가 많다 (Sadeghipour *et al.*, 2005). 넓은 의미의 플라보노이드는 안토크산틴류 (anthoxanthins)와 안토시아닌류 (anthocyanins), 카테킨류 (catechins)를 포함하지

만, 좁은 의미에서는 안토크산틴류는 꽃잎이 노란색을 띠게 하고, 가을에 잎이 자색이나 적자색을 띠게 하는 주원인이 된다. Apigenin과 luteolin은 항균·항암·항바이러스·항알레르기 및 항염증 활성을 지니며, 독성은 거의 나타나지 않는 것으로 보고되고 있다 (Kandaswami and Middleton, 1994; Bors and Saran, 1987; Rice-Evans and Miller, 1996). 또한 모든 질병의 원인이 되는 생체 내 산화작용을 억제한다는 사실이 알려지면서 (Robak and Gryglewski, 1988) apigenin과 luteolin을 비롯한 플라보노이드계 물질을 이용한 항산화제의 개발 및 활용에 관한 관심이 지속적으로 커지고 있다.

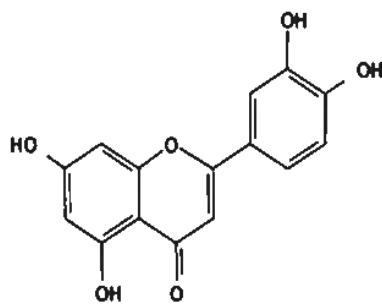
따라서 본 연구에서는 자외선에 의해 증가된 활성산소종과 피부의 제 1형 및 3형 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-1 및 -13의 활성 및 발현에 대한 apigenin과 luteolin의 억제 효과 및 작용기전을 규명하여 apigenin과 luteolin의 자외선에 의한 피부노화 및 손상 억제 효과를 조사하였다.



*Fig. 1. Model depicting solar UV irradiation damage to skin connective tissue (Fisher *et al.*, 2002).*



Apigenin



Luteolin

Fig. 2. Structure of apigenin and luteolin

II. 재료 및 방법

II-1. 재료 및 시약

Apigenin, luteolin 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)은 시그마 사 (Sigma, USA.)에서 구입하였고, SDS-PAGE gel 은 Invitrogen (Carlsbad, CA)에서 구입하였다. anti-phospho-c-Jun과 total c-Jun antibody는 Santa cruz biotechnology사에서 구입하였고, c-Fos antibody는 Calbiochem (San Diego, CA)에서 구입하였으며, anti-phospho-ERK, anti-phospho-JNK, anti-phospho-p38 antibody는 Cell signaling Technology (Beverly, MA)에서 구입하였다. MMPs 활성을 측정하는 enzo-lyte kit는 Anaspec. Ltd에서 구입하였으며, DMEM, LipofectAMIN 2000, FBS, 및 penicillin-streptomycin solution은 Invitrogen, Inc.에서 구입하였다.

II-2. 세포배양, 시약 처리 및 UVA 조사

Human keratinocyte cell line HaCaT의 세포배양은 10% Fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 unites/ml penicillin, 그리고 100 µg/ml streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 100 mm dish에는 2×10^6 cells/ml의 세포로 배양하고, 6-well plate에는 3.5×10^5 cells/ml의 세포를 배양하여 실험에 사용하였다. 시료 처리는 HaCaT에 apigenin과 luteolin을 각각 다양한 농도로 처리하였다. 처리된 시료는 DMSO (dimethylsulfoxide)에 녹였으며, 처리된 시료는 DMSO의 최종 농도가 0.2%를 넘지 않

도록 하였다. UVA lamp는 CL-1000L (UVP, Inc.)모델을 사용하였으며 365 nm의 파장을 갖는다. 배양 된 세포를 PBS로 1회 세척 후 바로 UVA를 조사하였다.

II-3. 세포독성 측정

Apigenin과 luteolin의 세포에 대한 독성을 조사하기 위해 MTT assay를 수행하였다. HacaT 세포를 96 well plate에 2×10^4 으로 분주하고 apigenin과 luteolin을 1, 5, 10, 25 μ M로 처리한 다음 24 시간 후 2 mg/ml의 MTT를 처리하였다. 4시간 뒤 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck)용액을 well당 100 μ l씩 넣고 균일하게 혼합한 뒤 Thermocycler ELISA Reader에서 흡광 540 nm에서 측정하여 세포의 활성도를 대조군에 대한 실험군의 formazan 결정의 흡광도로 아래와 같이 계산하였다.

세포 독성 (Cell viabilaty) (%)

$$= \frac{\text{Absorbance of experimental wells}}{\text{Absorbance of control wells}} \times 100$$

II-4. 활성산소종 (ROS) 생성능 측정

HaCaT 세포를 48 well plate에 FBS 0.1%의 배양액으로 24시간 계대 배양한 후 다시 0.1%의 혈청이 첨가된 배지에 배양하여 apigenin과 luteolin을 24 시간 전처리 하였다. 24 시간 후에 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 10 μ M을 각 well에 분주하여 30분 동안 발색 반응시킨 후 배지를 제거하고 0.1%의 FBS를 첨가한 배지로 다시 바꿔주었다. UVA 조사 후 Excitation 495 nm, Emission 520 nm에서 형광 측정하였다.

II-5. MMP-1 및 -13 효소 활성 측정

HaCaT 세포를 48 well plate에 계대 배양 후 apigenin과 luteolin을 24 시간 전 처리하고 PBS로 1회 세척한 후 UVA를 조사하고, 24 시간 후에 상층액을 회수하여 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 96 well plate에 상층액 50 μ l과 최종 농도 1 mM의 4-aminophenylmercuric acetate (APMA)를 넣어 잘 섞어준 후 MMP-1 효소 활성은 37°C에서 6 시간 반응 시키고 MMP-13 효소 활성은 37°C에서 40 분간 반응시켰다. 각각의 시간이 지난 후 MMP-1과 MMP-13에 해당하는 기질용액을 첨가하여 섞어준 후 Excitation 340 nm, Emission 490 nm에서 형광 측정하여 MMP-1 및 MMP-13 효소 활성 저해 효과를 측정하였다.

II-6. MMP-1 및 -13 유전자 발현 측정

MMP-1 및 MMP-13의 유전자 발현 억제효과를 조사하기 위하여 HaCaT 세포에 apigenin과 luteolin을 24 시간 전 처리하고 PBS로 1회 세척 후 UVA를 조사하여 24 시간 후에 배양한 세포를 4M guanidium thiocyanate에 용해시켜 전체 세포 내 RNA를 분리확인 후, RNA 0.2 μ g을 0.5 μ g의 oligo d(T) primer (18-mer)와 2.5 mM dNTP, 1 unit 역전사 효소를 이용하여 42°C에서 90 분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이렇게 합성한 cDNA를 이용하여 MMP-1과 -13 유전자의 특이적 primer (Table. 1)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 MMP-1, -13 및 GAPDH는 520, 395, 그리고 983 bp 크기로 1% agarose gel (1 \times TAE)상에서 Ethidium Bromide (EtBr)을 사용하여 확인하였다. 전기영동 후 image analyzer system (KODAK)과 PC image analyzer (NIH Imager)를 사용하여 정량 하였다.

II-7. 형질전환

① 형질전환을 위한 플라스미드의 제조

Ap-1 gene의 전사조절 부위를 3 copy로 합성하여 플라스미드를 Luciferase가 발현되는 벡터를 이용하여 제조하였다. 이 플라스미드를 *E. coli*에 형질전환 시킨 후 antibiotic resistance를 가진 colony를 분리해 냈다. Colony를 분리하여 플라스미드를 정제한 후 제한 효소 처리하여 agarose gel에서 확인하였으며 sequencing을 통해 완전한 플라스미드 construct를 밝혔다.

② AP-1 Luciferase활성도 측정

HaCaT cells을 2.5×10^5 cells/ml의 농도로 0.1% FBS가 함유된 DMEM 배지에 plating하였다. 24 시간 뒤 PBS로 2회 세척하고 LipofectAMINE 2000을 이용하여 형질전환 시켰다. 즉 세포에 0.2 μ g의 pCMV- β -gal, 1 μ g의 AP-1-Luc, LipofectAMINE 2000을 각 well에 넣은 후 4 시간 형질전환 시켰다. 4 시간 뒤 세포에 0.1% FBS가 함유된 DMEM 배지에 vehicle, apigenin과 luteolin을 처리하였다. 24 시간 배양을 끝낸 후 PBS로 1회 세척하고 UVA 조사 후 0.1% FBS가 함유된 DMEM 배지에 배양하였다. 12 시간 뒤에 세포를 수확하여 PBS로 한번 세척 후, lysis buffer를 처리하고 3차례의 급속 냉동-해동을 거쳐 세포를 파괴하고 12,000 xg, 5분간 원심분리 하여 세포 추출물을 얻어 Luciferase 활성도 측정에 사용하였다.

II-8. *c-Jun* 및 *c-Fos* 유전자 발현 측정

c-Jun 및 *c-Fos*의 유전자 발현 억제효과를 조사하기 위하여

HaCaT 세포에 apigenin과 luteolin을 24 시간 전처리하고 PBS로 1 회 세척 후 UVA를 조사하여 24 시간 후에 배양한 세포를 4M guanidium thiocyanate에 용해시켜 전체 세포 내 RNA를 분리확인 후, RNA 0.2 μg 을 0.5 μg 의 oligo d(T) primer (18-mer)와 2.5 mM dNTP, 1 unit 역전사 효소를 이용하여 42°C에서 90 분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이렇게 합성한 cDNA를 이용하여 c-Jun 및 c-Fos 유전자의 특이적 primer (Table. 1)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 c-Jun, c-Fos 및 GAPDH는 520, 395, 그리고 983 bp 크기로 2% agarose gel (1 × TAE)상에서 Ethidium Bromide (EtBr)을 사용하여 확인하였다. 전기영동 후 image analyzer system (KODAK)과 PC image analyzer (NIH Imager)를 사용하여 정량 하였다.

II-9. c-Jun 및 c-Fos 단백질 발현 측정

세포의 배양액을 제거하고 1 × PBS로 씻어준 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT)를 이용하여 4 °C에서 30분 동안 반응시켜서 과쇄하고, 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 단백질을 정량은 Bradford method로 수행하였다. 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE gel (invitrogen, Carlsbad, CA)을 걸고 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 90 V로 2시간 동안 transfer 시켰다. 이 membrane을 1 × TBS/T buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 녹인 5% skimmed milk로 상온에서 1시간 동안 blocking시킨 후 각각의 antibody들을 1 : 1500으로 희석하여 12 시간 반응시켰다. 1 × TBS/T buffer로 10분씩 3번 씻어주고,

p-c-Jun의 secondary antibody인 anti-goat antibody와 c-Jun 및 c-Fos의 secondary antibody인 anti-rabbit antibody에 두 시간 동안 반응시켰다. c-Fos의 대조군 단백질로써 actin을 사용하였다. 1 × TBS/T buffer로 10분씩 3번 세척한 후 ECL solution A와 solution B를 사용하여 현상하였다.

II-10. MAP kinase 활성 측정

세포의 배양액을 제거하고 1 × PBS로 씻어준 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT)를 이용하여 4 °C에서 30분 동안 반응시켜서 파쇄하고, 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 단백질 정량은 Bradford method로 수행하였다. 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE gel (invitrogen, Carlsbad, CA)을 걸고 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 90 V로 2시간 동안 transfer 시켰다. 이 membrane을 1 × TBS/T buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 녹인 5% skimmed milk로 상온에서 1시간 동안 blocking시킨 후 각각의 antibody들을 1 : 1500으로 희석하여 12 시간 반응시켰다. 1 × TBS/T buffer로 10분씩 3번 씻어주고, secondary antibody인 anti-rabbit antibody에 두 시간 동안 반응시켰다. 다시 1 × TBS/T buffer로 10분씩 3번 씻은 뒤 ECL solution A와 solution B를 사용하여 현상하였다.

II-11. 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA with t -test 방법을 사용하였으며, p값이 0.05 보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

Gene	Primer sequence (sense, antisense)	size (bp)	Tm (°C)	cycle
GAPDH	5-GAT/GAA/TTC/TGA/AGG/TCG/ GAG/TC A/ACG/GAT/TTG/GT-3 5-GAT/AAG/CTT/CAT/GTG/GGC/CAT/GAG /GTC/CAC/CAC-3	983	60	25
MMP-1	5-GGA/GGG/GAT/GCT/CAT/TTT/GAT/G-3 5-TAG/GGA/AGC/CAA/AGG/AGC/TGT-3	520	62	26
MMP-13	5-TTG/TTG/CTG/CGC/ATG/AGT/TCG-3 5-GGG/TGC/TCA/TAT/GCA/GCA/TCA-3	395	60	30
c-Jun	5-GGA/TCA/AGG/CGG/AGA/GGA/AG-3 5-GCG/TTA/GCA/TGA/GTT/GGC/AC-3	196	55	30
c-Fos	5-GGA/GAA/TCC/GAA/GGG/AAA/GG-3 5-GCT/TGG/GCT/CAG/GGT/CAT/TG-3	332	55	30

Table 1. PCR primer sequence

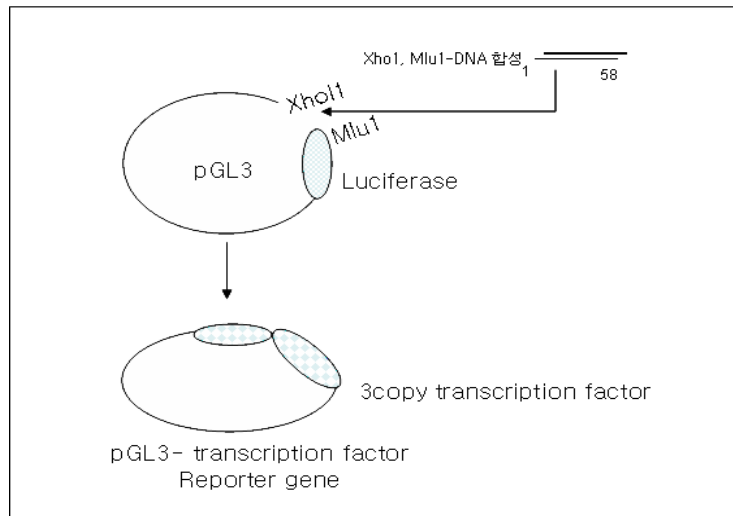


Fig. 3. Construction of the reporter gene plasmids. Three copies of each transcription factor binding sequences were inserted in the *MluI* and *XhoI* site.

Ⅲ. 결과

Ⅲ-1. *Apigenin*과 *luteolin*의 세포독성

*apigenin*과 *luteolin*의 세포독성이 없는 농도를 확인하기 위하여 Human keratinocytes인 HacaT cell에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide: MTT 방법을 이용하여 세포독성을 확인하였다. Human keratinocytes에서 *apigenin*과 *luteolin*의 MTT assay를 수행한 결과 세포 생존도에 영향을 미치지 않는 농도는 Fig. 4에 보여지는 바와 같이 *apigenin*과 *luteolin*의 10 μ M 까지 세포독성이 나타나지 않았으며 (Fig. 4), 본 연구에서는 5 μ M 까지 처리하였다.

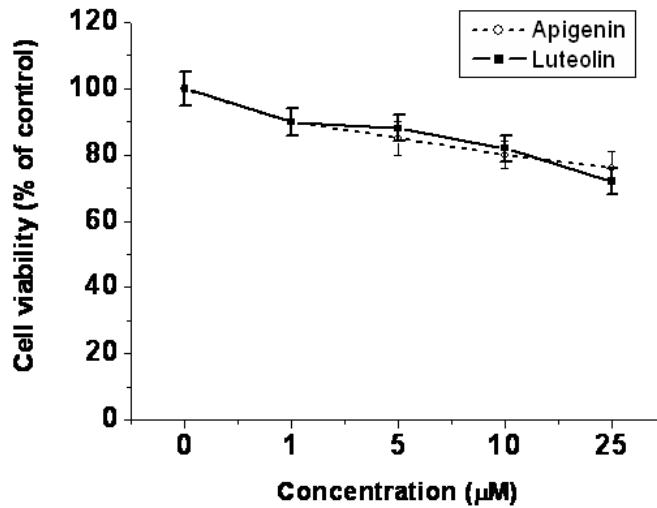


Fig. 4. Effect of apigenin and luteolin on cells viability. HaCaT cells were treated with the apigenin and luteolin for 24 h. Cell toxicity was estimated using the tetrazolium salt reduction test (MTT). The result are presented as means \pm S.E. of triplicates.

III-2. 활성산소종 (ROS) 형성에 대한 영향

ROS의 발생은 UV에 의해 유도되는 MAP kinase-mediated signal transduction에 결정적 역할을 하며, ROS가 발생되면 MMP-1의 발현이 증가되고, 이러한 ROS의 활성을 억제하는 물질들은 UV에 의해 유도되는 MMP-1, -13의 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있다 (Wenk *et al.*, 1999). 최근 연구에서, in vivo 실험을 통해 인체 피부에 UV를 조사하면 H₂O₂ level이 급격하게 증가하였으며, ROS의 초기 증가는 MAP kinase cascade를 유발하게 되는데 이에 항산화제 (Genistein, N-acetyl cysteine (NAC))를 국소처리하면 MAP kinase pathway의 활성화를 제어하게 됨으로써 UV에 의해 유도된 MMPs expression을 억제시킨다는 보고가 있다 (Kang *et al.*, 2003). Apigenin과 luteolin의 ROS 생성능 억제효과를 조사하기 위하여 HaCaT 세포에 apigenin, luteolin 및 positive control인 NAC을 UVA 조사하기 전에 처리한 결과, UVA에 의해 증가된 세포내 ROS의 형성이 apigenin과 luteolin에 의해 억제되었다 (Fig. 5).

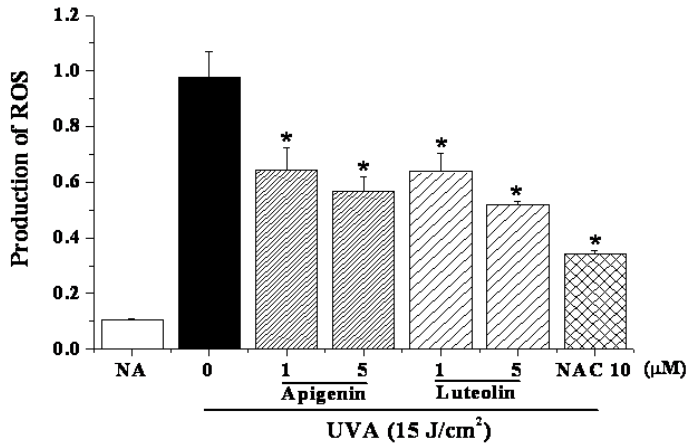


Fig. 5. Effects of apigenin and luteolin on UVA-induced cellular ROS production in HaCaT cells. HaCaT cells were treated with apigenin and luteolin for 24 h and then the cells were exposed to 15 J/cm² of UVA. ROS production was measured after irradiation. Each bar shows the mean ± S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. **P* < 0.05, significantly different from the UVA irradiation control.

III-3. MMP-1 및 -13 효소 활성 저해

MMP-1은 type I collagenase이며, MMP-13은 type III collagenase로 UVA에 의해 활성화되어 콜라겐 분해에 관여하는 것으로 알려져 있으며 (Grimm *et al.*, 2004), 각질세포, 상피세포 및 염증성 세포에서 UVA에 의해 유도된 MMPs (MMP-1, 13)의 증가로 인해 분해되는 세포외기질의 과도한 손상은 피부 조직 손상 및 노화와 직접적인 연관이 있다고 보고되어 있다 (Uitto, 1986). Apigenin과 luteolin의 UV에 의한 피부 노화 및 손상 억제 효과를 규명하기 위하여 MMP-1 및 -13 효소 활성 저해효과를 조사하였다. HaCaT 세포를 이용하여 apigenin과 luteolin을 24 시간 전 처리 후 UVA를 조사하였으며 24 시간 후 collagenase assay를 수행한 결과, Type I collagenase와 (Fig. 6) Type III collagenase의 활성이 apigenin과 luteolin에 의해 농도 의존적으로 저해되었다 (Fig. 7).

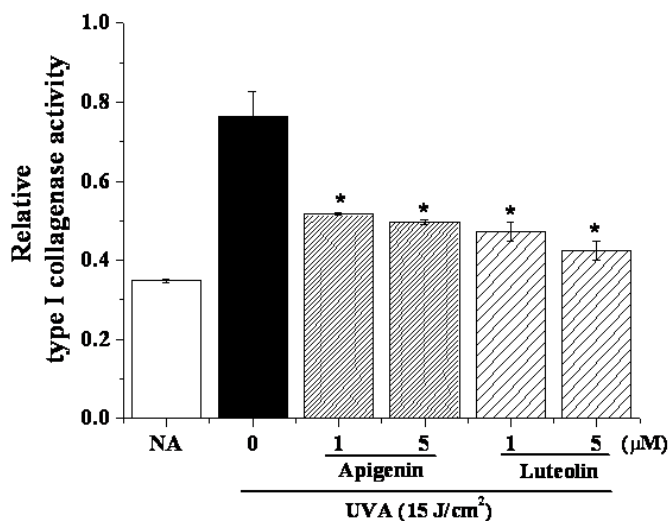


Fig. 6. Effect of apigenin and luteolin on the type I collagenase activity. HaCaT cells were treated with apigenin and luteolin for 24 h. The cells were then irradiated with 15 J/cm² of UVA and incubated for 24 h. The level of collagenase production in the culture medium was determined by enzo-lyte system. Each bar shows the mean \pm S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. * $P < 0.05$, significantly different from the UVA irradiation control.

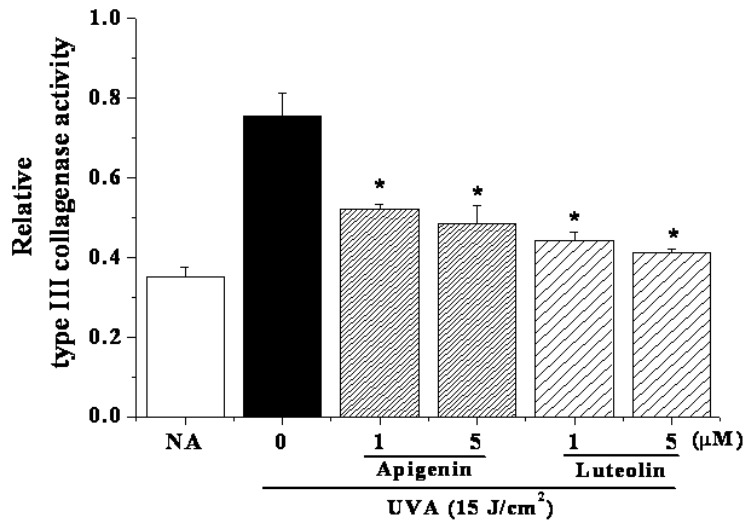


Fig. 7. Effect of apigenin and luteolin on the type III collagenase activity. HaCaT cells were treated with apigenin and luteolin for 24 h. The cells were then irradiated with 15 J/cm² of UVA and incubated for 24 h. The level of collagenase production in the culture medium was determined by enzo-lyte system. Each bar shows the mean ± S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. **P* < 0.05, significantly different from the UVA irradiation control.

III-4. MMP-1 및 -13 유전자 발현 억제

MMPs는 growth factors, cytokines, tumor promoters 및 ultraviolet (UV) 등과 같은 다양한 외부 자극인자에 의해서 과발현된다 (Fisher *et al.*, 2002). 또한 피부 섬유아세포에서 UV에 의해 유도된 MMPs의 다양한 발현은 collagen이나 다른 세포외기질 (extracellular matrix : ECM)의 파괴를 유도하기 때문에 MMPs의 활성화는 피부 노화와 밀접한 관계를 가지고 있다 (Fisher and Voorhees, 1998). Apigenin과 luteolin의 MMP-1 및 MMP-13 유전자 발현에 대한 영향을 조사하기 위하여 HaCaT 세포에 apigenin과 luteolin을 24 시간 전처리하고 UVA를 조사하였다. Serum-free media로 교체하고 24 시간 후에 MMP-1 및 MMP-13의 유전자 발현을 RT-PCR를 이용하여 측정된 결과, UVA에 의해 증가되었던 MMP-1 및 MMP-13 유전자 발현이 apigenin과 luteolin에 의해 감소하였다 (Fig. 8).

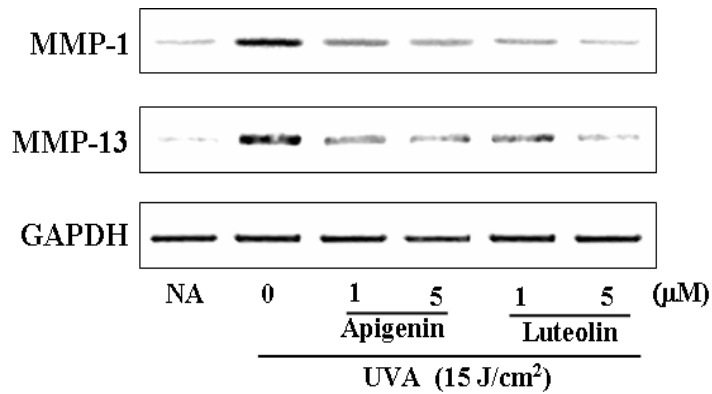


Fig. 8. Effects of apigenin and luteolin on UVA-induced MMP-1 and MMP-13 mRNA expression. HaCaT cells were pretreated with apigenin and luteolin for 24 h. The cells were then irradiated with 15 J/cm² of UVA and incubated for 24 h. Cells were lysed and total RNA was prepared the house keeping gene, GAPDH, was performed for each sample. The PCR products were electrophoresed in 1% agarose gel and stained with ethidium bromide.

III-5. AP-1 전사인자 활성화도

UVA에 의해 피부상피세포에서 ROS가 증가하고, 증가된 ROS가 세포내 전사인자인 AP-1(activator protein-1)의 활성도를 증가시켜 MMPs의 발현을 증가시킬 수 있는 것에 미루어 (Brenneisen *et al.*, 1997), apigenin과 luteolin에 의한 전사인자 AP-1의 전사 활성 억제 효과를 확인하였다. HaCaT 세포에 3 copy Ap-1 luciferase 벡터를 Lipofectamine을 이용하여 transfection 시킨 후 apigenin 및 luteolin을 24시간 전처리하고, AP-1 전사활성을 증가 시키는 UVA를 조사하여 AP-1-luciferase reporter gene assay를 수행하였다. 그 결과 UVA에 의해 증가된 AP-1의 전사 활성화도가 apigenin과 luteolin에 의해 감소하였다 (Fig. 9).

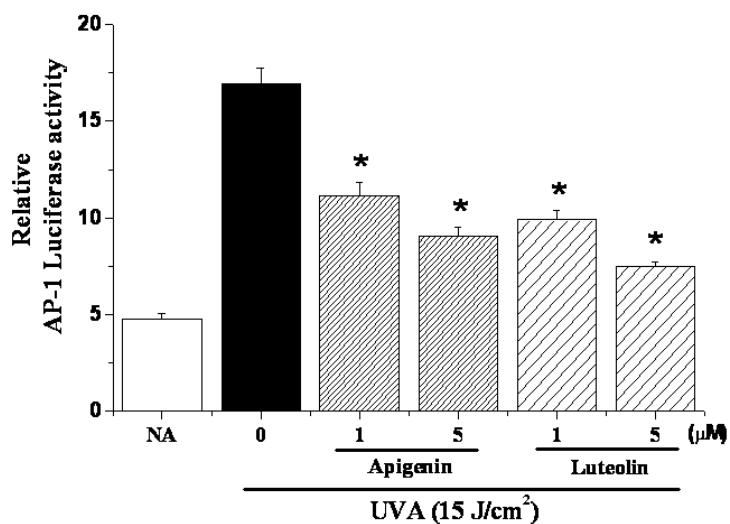


Fig. 9. Effects of apigenin and luteolin on UVA-induced AP-1 promoter activity. HaCaT cells were transiently co-transfected with pGL3-AP-1-Luc and pCMV- β -gal. After 18 h, cells were treated with apigenin and luteolin in serum free medium for 24 h and irradiated with 15 J/cm² of UVA. After 12 h, cells were harvested, and then luciferase and β -galactosidase activities were determined. Each bar shows the mean \pm S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. * $P < 0.05$, significantly different from the UVA irradiation control.

III-6. *c-Jun* 및 *c-Fos* 유전자 발현

UVA에 의해 유도된 AP-1의 활성화는 AP-1 복합체를 형성하는 *c-Jun* 및 *c-Fos*의 발현이 증가됨으로서 일어나므로 (Chen *et al.*, 1998) UVA에 의해 증가되었던 AP-1 전사활성도가 apigenin 과 luteolin에 의해 감소하는 것을 확인 후 (Fig. 9) AP-1 전사인자에 영향을 미치는 *c-Jun* 및 *c-Fos*의 유전자 발현 억제효과를 조사하기 위하여 세포에 apigenin과 luteolin을 24 시간 전처리하고 UVA를 조사하였다. Serum-free media로 교체하고 24 시간 후에 *c-Jun* 및 *c-Fos*의 유전자 발현을 RT-PCR를 이용하여 측정된 결과, UVA에 의해 증가되었던 *c-Jun* 및 *c-Fos* 유전자 발현이 apigenin 과 luteolin에 의해 감소하였다 (Fig. 10).

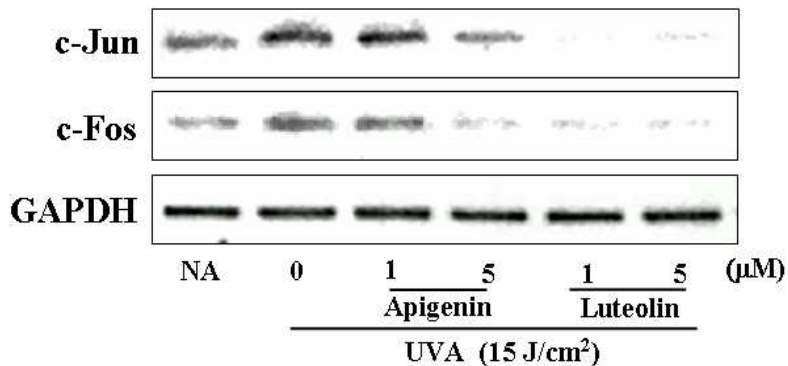


Fig. 10. Effects of apigenin and luteolin on UVA-induced c-Jun and c-Fos mRNA expression. HaCaT cells were pretreated with apigenin and luteolin for 24 h. The cells were then irradiated with 15 J/cm² of UVA and incubated for 24 h. Cells were lysed and total RNA was prepared the house keeping gene, GAPDH, was preformed for each sample. The PCR products were electrophoresed in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

III-7. *c-Jun* 및 *c-Fos* 단백질 발현

UV에 의해 유도되는 AP-1 activation은 MMP-1 promoter의 AP-1 결합부위가 있어 MMP-1 발현이 증가하면 AP-1 activation도 증가하게 된다 (Brenneise *et al.*, 2002). AP-1 복합체는 Jun과 Fos 집합체로 구성되어 있는데 (Karin, 1995; Whitmarsh and Davis, 1996), apigenin과 luteolin의 UV에 의해 유도되는 *c-Jun* phosphorylation/expression 및 *c-Fos* expression 억제 효과를 조사하기 위해 HaCaT 세포에 24 시간 전처리 하고 UVA를 조사한 결과 UVA에 의해 *c-Jun* phosphorylation/expression 및 *c-Fos* expression이 증가하였으며, apigenin과 luteolin에 의해 *c-Jun* phosphorylation 및 *c-Fos* expression이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 11).

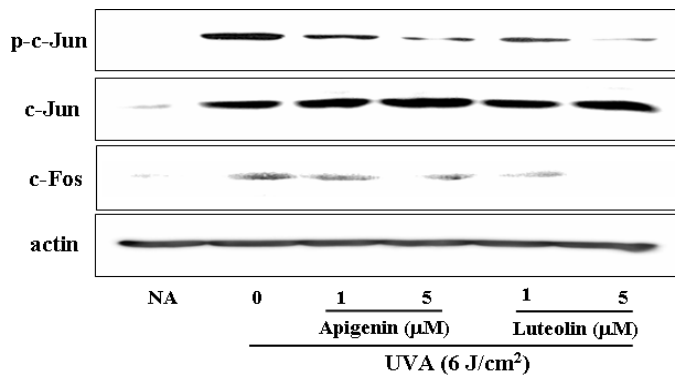


Fig. 11. Effects of apigenin and luteolin on UVA-induced c-Jun and c-Fos expression. HaCaT cells cultured in DMEM until 80% confluent and then starved with DMEM containing 0.1% FBS and treated with apigenin. After 24 h, the cells were washed with PBS and irradiated with 6 J/cm² of UVA in PBS. Irradiated cells were cultured for 10 h. The cells were lysated and subjected to Western blotting using c-Jun phosphorylation/expression and c-Fos expression. Levels of total (t-) c-Jun and actin were used as loading controls.

Ⅲ-8. MAP kinases 활성화

Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) 신호전달 과정은 MMP 발현이 포함되는 다양한 세포질 기능을 조절하는 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Waskiewicz and Cooper 1995), 최근 연구 보고에 따르면 UV 조사 후 MAP kinase cascade와 같은 protein kinase cascades의 활성을 유도하는 growth factor 수용체들이 활성화되어 콜라겐 분해가 증가되는 것으로 알려져 있다 (Fisher *et al.*, 2002). Apigenin과 luteolin의 UVA에 의해 유도되는 MAP kinase 활성화 억제 효과를 측정하기 위하여 western blotting을 수행한 결과 UVA에 의해 유도된 ERK, JNK 및 p38-dependent MAP kinase 활성화가 apigenin (Fig. 12)과 luteolin (Fig. 13)에 의해 억제되는 것을 확인하였다.

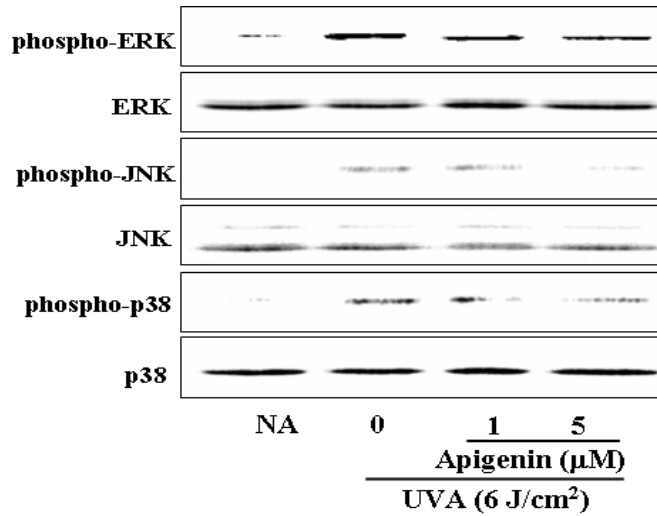


Fig. 12. Effects of apigenin on UVA-induced MAP kinase activity. HaCaT cells cultured in DMEM until 80% confluent and then starved with DMEM containing 0.1% FBS and treated with apigenin. After 24 h, the cells were washed with PBS and irradiated with 6 J/cm² of UVA in PBS. Irradiated cells were cultured for 30 min. The cells were lysated and subjected to Western blotting using phospho-specific (p-) ERK, JNK, and p38 antibodies. Levels of total (t-) ERK, JNK, and p38 were used as loading controls.

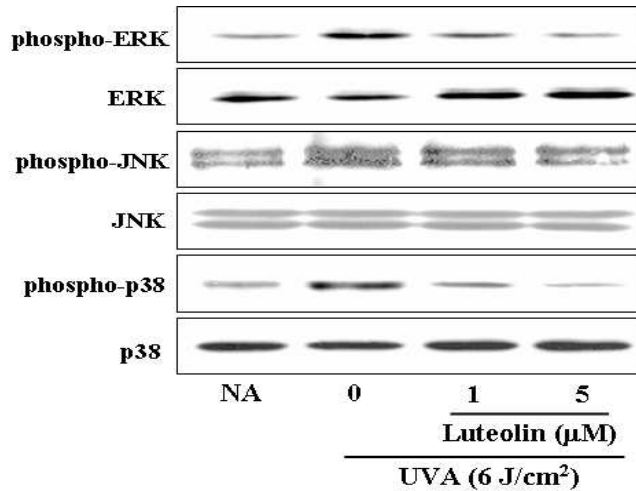


Fig. 13. Effects of luteolin on UVA-induced MAP kinase activity. HaCaT cells cultured in DMEM until 80% confluent and then starved with DMEM containing 0.1% FBS and treated with luteolin. After 24 h, the cells were washed with PBS and irradiated with 6 J/cm^2 of UVA for in PBS Irradiated cells were cultured for 30 min. The cells were lysated and subjected to Western blotting using phospho-specific (p-) ERK, JNK, and p38 antibodies. Levels of total (t-) ERK, JNK, and p38 were used as loading controls.

IV. 고 찰

태양에서 나오는 광선의 일종인 자외선은 사람의 피부와 매우 밀접하게 관계한다. 태양광선은 파장에 따라 가시광선, 적외선, 자외선으로 나뉘는데 그 중 피부에 가장 큰 영향을 미치는 것이 바로 자외선이다. 자외선은 피부 파장이 긴 것부터 UVA (320-380 nm), UVB (280-320 nm), UVC (200-280 nm)로 나뉘어 지는데 데 특히 피부에 영향을 주는 것은 UVA, UVB이다 (Ho, *et al.*, 2005; Moon, *et al.*, 2005). 대표적인 UVA에 의한 피부 손상으로는 피부 기저층의 멜라닌 색소의 증가로 피부가 검어지거나, 진피의 섬유질을 변화시켜 노화를 촉진시킨다. UVB에 의한 피부 손상으로는 피부 염증 등이 있다 (Tanaka *et al.*, 2005). 최근 각질세포, 상피세포 및 염증성 세포에서 UVA에 의해 유도된 MMPs (MMP-1, 13)의 증가로 인해 분해되는 세포외기질의 과도한 손상은 피부 조직 손상 및 노화와 직접적인 연관이 있다고 보고되어 있다 (Uitto, 1986). 일반적으로 UVB는 인체의 정상 표피에서 MMP-1, MMP-3 그리고 MMP-9의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있으며 (Fisher *et al.*, 1996), UVA는 표피와 진피에서 MMP-1, -13 등의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Chung *et al.*, 2002).

Apigenin과 luteolin의 UV에 의한 피부 노화 및 손상 억제 효과를 조사하기 위해 apigenin과 luteolin의 UVA 조사로 인해 증가된 MMPs 효소 활성 및 유전자 발현에 대한 영향을 조사한 결과 UVA 조사로 인해 증가된 collagenases (MMP-1, -13) 효소 활성 및 발현이 apigenin과 luteolin에 의해 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 6, 7, 8). Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) 신호전달 과정은 MMP 발현이 포함되는 다양한 세포질 기능을 조절하는 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Waskiewicz and Cooper, 1995), 최근 연구 보고에 따르면 UV 조사 후 MAP kinase

cascade와 같은 protein kinase cascades의 활성을 유도하는 growth factor 수용체들이 활성화되어 콜라겐 분해가 증가되는 것으로 알려져 있다 (Fisher *et al.*, 2002). Apigenin과 luteolin의 MAP kinase 활성 억제 효과를 측정하기 위하여 western blotting을 수행한 결과 UVA에 의해 유도된 ERK, JNK 및 p38-dependent MAP kinase 활성이 apigenin에 의해서는 감소하지 않았고, luteolin에 의해 ERK MAP kinase 활성이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 12, 13). 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 발생은 UV에 의해 유도되는 MAP kinase-mediated signal transduction에 결정적 역할을 하며, ROS가 발생되면 MMP-1의 발현이 증가되고, 이러한 ROS의 활성을 억제하는 물질들은 UV에 의해 유도되는 MMP-1, -13의 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있다 (Wenk *et al.*, 1999; Lo and Cruz, 1995). 최근 연구에서 인체 피부에 UV를 조사하면 H₂O₂ level이 급격하게 증가하였으며, ROS의 초기 증가는 MAP kinase cascade를 유발하게 되는데 이에 항산화제 (Genistein, N-acetyl cysteine)를 국소처리하면 MAP kinase pathway의 활성화를 제어하게 됨으로써 UV에 의해 유도된 MMPs expression을 억제시킨다는 보고가 있다 (Kang *et al.*, 2003). 본 연구에서 인체 각질 세포주인 HaCaT 세포에 apigenin과 luteolin을 UVA 조사하기 전에 처리한 결과 UVA에 의해 증가된 세포내 활성 산소종의 형성이 억제되어 apigenin과 luteolin 역시 항산화 효과가 있음을 증명하였다. MMP-1, MMP-3 및 MMP-9와 같은 다양한 MMPs의 유전자 발현은 AP-1 전사 조절 인자에 의해 조절되며 (Rittie and Fisher, 2002), AP-1 활성의 증가는 MMPs에 의한 세포외기질 단백질 (ECM protein (collagen))들의 절단에 중요한 역할을 한다 (Bachelor *et al.*, 2005). 본 연구에서는 인체 각질 세포주인 HaCaT 세포에 apigenin과 luteolin을 UVA 조사하기 전에 처리한 결과 UVA에 의해 c-Jun phosphorylation/expression 및 c-Fos expression이 유도되고, 이는

AP-1 활성화를 야기시키는 것을 확인하였으며, apigenin과 luteolin이 UVA에 의해 증가한 c-Jun phosphorylation 및 c-Fos expression을 억제하고, 결국 UV에 의해 유도된 AP-1 활성화를 억제시키는 것을 확인하였다 (Fig. 9, 10, 11). UVA에 노출된 피부 각질 세포에서의 유도된 MMPs (MMP-1, -13)에 의해 콜라겐이 분해되어 피부 손상이 유발되는데, 본 연구 결과 apigenin과 luteolin의 처리는 UVA에 의해 유도되는 MMP-1 및 -13의 효소 활성 및 유전자 발현을 억제시켜 UVA에 의해 야기되는 피부 연결 조직의 손상을 보호하거나 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다. 궁극적으로 화학물질과는 달리 독성이 없는 천연소재인 apigenin과 luteolin을 이용한 본 연구 논문은 피부 노화 및 손상 억제에 대한 과학적인 기초 자료로서 이용 될 수 있을 것으로 기대된다.

V.참 고 문 헌

- Bachelor, M.A., Cooper, S.J., Sikorski, E.T. and Bowden, G.T. (2005) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase decreases UVB-induced activator protein-1 and cyclooxygenase-2 in a SKH-1 hairless mouse model. *Mol. Cancer. Res.* 3: 90-99.
- Brenneisen, P., Briviba, K., Wlaschek, M., Wenk, J. and Scharffetter-Kochanek, K. (1997) Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free. Radic. Biol. Med.* 22: 515-524.
- Brenneisen, P., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. (2002) Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973: 31-43.
- Chen, C.C., Chow, M.P., Huang, W.C., Lin, Y.C. and Chang, Y.J. (2004) Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Mol Pharmacol.* 66: 683-693.
- Chen, W., Borchers, A.H., Dong, Z., Powell, M.B. and Bowden, G.T. (1998) UVB irradiation-induced activator protein-1

activation correlates with increased c-Fos gene expression in a human keratinocyte cell line. *J. Biol. Chem.* 273: 32176-32181

Chung, J. H., Seo, J.Y., Lee, M.K., Eun, H.C., Lee, J.H., Kang, S., Fisher, G.J. and Voorhees, J.J. (2002) Ultraviolet modulation of human macrophage metalloelastase in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 119: 507-512.

Fisher, G.J. and Voorhees, J.J. (1998) Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 3: 61-68.

Fisher, G.J., Datta, S., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, James., Kang, S. and Voorhees, J.J. (1996) Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature.* 379: 335-339

Fisher, G.J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S. and Voorhees, J.J. (2002) Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol.* 138: 1462-1470.

Grimm, T., Schafer, A. and Hogger, P. (2004) Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Free Radic. Biol. Med.* 36: 811-822.

- Ho, J.N., Lee, Y.H., Park, J.S., Jun, W.J., Kim, H.K., Hong, B.S., Shin D.H. and Cho, H.Y. (2005) Protective Effects of Aucubin Isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-Induced Oxidative Stress in Human Skin Fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 1244-1248.
- Jenkins, G. (2002) Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing. Dev.* 123: 801-810
- Kandaswami, C. and Middleton, J.E. (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 366: 351-376.
- Kang, S., Chung, J.H., Lee, J.H., Fisher, G.J., Wan, Y.S., Duell, E.A. and Voorhees, J.J. (2003) Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 120: 835-841.
- Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270: 16483-16486.
- Lateef, H., Stevens, M.J. and Varani, J. (2004) All-trans-retinoic acid suppresses matrix metalloproteinase activity and increases collagen synthesis in diabetic human skin in organ culture. *Am. J. Pathol.* 165: 167-174.

- Lo, Y.Y. and Cruz, T.F. (1995) Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 11727-11730.
- Mignatti, P. and Rifkin, D.B. (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* 73: 161-195.
- Moon, H.I., Lee, J., Kwak, J.H., Zee, O.P. and Chung J.H. (2005) Isoflavonoid from *Viola hondoensis*, regulates the expression of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 925-928.
- Rice-Evans, C.A. and Miller, N.J. (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans* 24: 790-795.
- Rittie, L. and Fisher, G.J. (2002) UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing. Res. Rev.* 1: 705-720.
- Robak, J. and Gryglewski, R.J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37: 837-841.
- Robinson, M.J. and Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 180-186.
- Sadeghipour, M., Terreux, R. and Phipps, J. (2005) Flavonoids and tyrosine nitration: structure.activity relationship correlation with enthalpy of formation *Toxicol. in Vitro.* 19: 155-165

- Shin, M.H., Rhie, G.E., Park, C.H., Kim, K.H., Cho, K.H., Eun, H.C. and Chung, J.H. (2005) Modulation of collagen metabolism by the topical application of dehydroepiandrosterone to human skin. *J. Invest. Dermatol.* 124: 315-323.
- Son, E.D., Lee, J.Y., Lee, S., Kim, M.S., Lee, B.G., Chang, I.S. and Chung, J.H. (2005) Topical application of 17 beta-estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating TGF-Beta signaling in aged human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 124: 1149-1161.
- Tanaka, K., Hasegawa, J., Asamitsu, K. and Okamoto, T. (2005) Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor kappaB inhibitor, parthenolide. *J. Pharmacol Exp Ther.* 315: 624-630.
- Uitto, J. (1986) Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Agerelated alterations in collagen and elastin. *Dermatol. Clin.* 4: 433-446.
- Waskiewicz, A.J. and Cooper, J.A. (1995) Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 798-805.
- Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Briviba, K., Oberley, T.D. and Scharffetter-Kochanek, K. (1999) Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in

mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloprotease-1. *J. Biol. Chem.* 274: 25869-25876.

Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J. (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* 74: 589-607.

감사의 글

앞만 보며 달려온 석사 2년 째 드디어 실험의 결실을 맺으며 졸업 논문을 쓰게 되었습니다. 제가 이 자리에 설 수 있게 많은 충고와 격려의 말씀을 전해주시던 지도 교수님께 감사의 말씀을 전합니다. 교수님의 사랑의 매가 있었기에 지금의 제가 이렇게 논문을 쓸 수 있었습니다. 다시 한 번 감사의 뜻을 전합니다. 실험실 생활을 하면서 빠질 수 없는 내 또 하나의 가족, 우리 실험실 식구들. 지영언니 덕분에 실험실 생활에 있어 필요한 공동체 의식을 배우게 되었고, 용필오빠, 우리 실험실의 맏형으로써 보살펴주셔서 감사합니다. 제가 더 많이 도와드렸어야 했는데 못해서 죄송해요. 형균오빠, 실험 가르치라 힘들다 그러면 술 사주라, 은행에 데려다 주라 힘드셨죠? 제가 자동차 사면 꼭 드라이브 시켜 줄게요. 지금은 내 선배님이 되어 많이 부족한 날 보듬어주고, 때론 충고도 해주는 은희 선배님, 고맙다. 기쁜 날 같이 기뻐해 주고 내가 슬플 때 같이 울어주며 위로해 준 널 잊을 수 없을 거야. 그리고 나의 평탄했던 인생에 새로운 자극제가 되어준 재호오빠, 오빠도 논문 쓰느라 고생 많았어요. 수진언니, 사회생활의 선배로써 조언도 많이 해주고, 실험할 때도 도와줘서 고마워요. 실험실에 와서 적응하느라 힘들었을 희선씨, 너무 조급해 하지 말고, 천천히 배운다 생각하세요. 그럼 언젠가 고지에 서 있을 희선씨를 발견할 거예요. 그리고 우리 실험실 막내 혜진아, 성격 더러운 이 언니랑 지내느라 수고했어. 너에게 많은 실험을 알려주고 챙겨줬어야 했는데 내 일에만 신경 쓰느라 널 챙겨주지 못해서 미안해. 항상 밝은 널 보면서 언니도 덩달아 신이 났었는데...이런 너의 모습 잃지 말고, 항상 초심을 갖고 실험 열심히 배우길 바란다. 나에게 없어서는 안될 친구들 은진언니, 지은언니, 수정아, 은정아, 먼 곳에서, 날 응원해 주고 때론 영양보충 시켜준 거 고마운 마음 항상 간직하고 있어. 힘들 때마다 기댈 수 있는 친구가 있다는 게 얼마나 고마운 일인지 알

지? 그런 삶의 동반자가 되어서 서로의 고민을 들어주고 부족한 부분을 채워주는 친구로 영원히 함께 했으면 좋겠어. 그리고 종정아, 두바이에서 연수 잘 마치고 훌륭한 요리사가 되어 돌아오길 바래. 9700 모임의 또 다른 회원, 진영오라버니, 기운 오라버니, 윤영오라버니, 현우오라버니, 은별이 우리 모임 끝까지 가는 거야, 회비는 꼭 제때에 내세요! 그리고 내가 학부생 때부터 옆에서 응원해준 재성오빠, 선영언니, 태한오빠, 홍석오빠, 내 졸업 동기 남희, 은진이, 세은이, 경진이, 설희, 에게 고마운 마음 전합니다. 지금은 한국에 없지만, 내가 석사과정을 밟을 수 있게 도와준 경식오빠, 예비 아기엄마가 된 미홍언니 옆에 있어준 것만으로도 고마워요. 두 분을 위해서 항상 기도할게요. 내 18년지기 친구 동배야, 내가 널 더 도와준 거 같지만, 그래도 고맙단 말을 해야겠지? 네가 무슨 일을 하든지 꼭 성공하길 바래. 지금 서울에서 열심히 애니메이션을 만드는 친구 철호야, 네가 만든 애니메이션을 볼 날이 얼른 왔음 좋겠다. 그리고 더운 여름에 팔빙수 들고 뛰어왔던 재길아, 너무 고마웠어. 내년에도 또 뛰어 주길 바래.

마지막으로 세상에 하나뿐인 우리 가족. 우리 3남매 모두 대학까지 보내기 위해 고생 많이 하신 아버지, 어머니. 이 감사의 글을 쓰면서 자꾸 눈물이 나는 건 아마 부모님의 기대를 저버리지 않기 위해 노력했던 순간들이 떠올라서 인거 같습니다. 언제나 감사한 마음은 있지만 단 한 번도 표현 못했던 못난 딸이 이제는 당당하게 말씀드릴게요. 엄마, 아빠 사랑합니다!!! 오빠, 란주도 하늘만큼 땅만큼 사랑해~ 그리고 내가 이 세상에서 제일 사랑하는 할머니 오래오래 건강하게 사셔야 해요

2006년 12월 눈오는 날에 지나간 여정을 마치며...
오교녀 올림.