pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 2, pp. 140~145 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.2.140

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

피부 섬유아세포에서 갈참나무 잎 추출물의 항산화 및 항노화 효능

최선일 · 이종석[1] · 이사라[1] · 여주홍[1] · 정태동 · 조봉연 · 최승현 · 심완섭 · 한웅호 · 이진하 · 김종대 · 이옥환*
강원대학교 식품생명공학과, [1]국립생물자원관 유용자원분석과

Antioxidant and Anti-aging Effects of Extracts from Leaves of the *Quercusaliena Blume* on Human Dermal Fibroblast

Sun-Il Choi, Jong Seok Lee[1], Sarah Lee[1], Joohong Yeo[1], Tae-Dong Jung, Bong-Yeon Cho, Seung-Hyun Choi, Wan-Sup Sim, Xionggao Han, Jin-Ha Lee, Jong Dai Kim, and Ok-Hwan Lee*
Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea
[1]Biological and Genetic Resources Assessment Division, National Institute of Biological Resources, Incheon, Korea
(Received January 22, 2018/Revised February 9, 2018/Accepted February 28, 2018)

ABSTRACT - The skin of the human body occupies the largest surface area of the body and acts as a protection for the person's internal organs. As such, the skin is a major target of oxidative stressors, and these oxidative stressors are known to contribute to skin aging over the course of time. For the most part, an antioxidant is an effective approach to utilize to prevent symptoms related to the reactive oxygen species (ROS)-induced aging of the skin. Therefore, we investigated the antioxidant and anti-aging activity of the leaves of the *Quercusaliena Blume* extract (QBE). In our study, we confirmed that the cell viability tested with XTT {2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt} assay was not affected up to a concentration of 100 μg/mL. In addition, the cell viability of HDF cells induced by hydrogen peroxide was recovered from 81% to 104% after treatment with QBE, which showed the greater protective effect than that of ascorbic acid. Treatments of QBE dose-dependently inhibited reactive oxygen species (ROS) production in HDF cells induced by hydrogen peroxide, which correlated with their protective effects on cell viability. Since QBE treatment exhibited the suppression effect of skin aging by decreasing the ROS production, QBE could be used as a not only natural anti-aging but also antioxidant resource.

Key words : Rreactive oxygen species, Human dermal fibroblast, Antioxidant, Anti-aging

피부는 대사산물 배설 및 체온을 조절하는 가장 큰 신체기관이며, 신체의 가장 바깥쪽에 위치하여 환경적, 물리적, 화학적 및 생물학적 요인에 대한 신체 보호에 중요한 역할을 하기 때문에 신체 내외부적으로 다양한 스트레스에 노출되어 노화 및 각종 질병을 일으킨다[1]. 피부 노화는 시간이 지남에 따라 발생하는 자연적인 노화 현상인 내인성노화와 환경 호르몬, 자외선 등 환경에 노출되어 생기는 외인성노화 나눌 수 있다[2]. 특히, 자외선에 의한 광노화는 활성산소 생성의 원인이 되며, 생성된 활성산소는 피부 항산화 기능을 파괴하고, 지질 과산화 반응을 개시하며, 단백질 및 DNA의 산화뿐만 아니라 피부 진피층에서 결합조직 성분인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합을 유발시킴으로써 탄력 저하, 색소 침착, 주름생성 등의 피부질환의 원인이 된다[3-5]. 따라서 합성 항산화제 보다 더 안전하고 효력이 강한 항산화제를 찾으려는 연구가 민간요법이나 한방에서 효능이 입증된 천연물을 중심으로 활발하게 이루어지고 있다[6,7].

나고야의정서로 인한 국내 유전자원의 보호를 위해 유전자원 관련 전통지식을 확보하려는 노력이 필요한 시점에서 국내 산림자원 중 식품원재료 database에 등재된 원료에 대한 효능을 평가하는 것은 매우 시의적절한 연구로 사료된다[8]. 국내 산림지역에서 자생하는 식물의 열매를 제외한 잎, 줄기 및 잔가지를 이용한 항산화 및 항노화 활성에 관한 연구가 많지 않고, 이를 이용하여 식품가공 원료로 적용한 연구도 초기단계에 불과하다. 따라서 본 연구팀은 전보[9]에서 국내 자생식물 45 종을 국립생물자원관으로부터 제공받아 항산화 성분 및 항산화 활성을 평가하였고, 이 중 효능이 우수하였던 갈참나무 잎을 70% 에탄올로 추출하여 피부 섬유아세포에서 항산화 및 항노화 효

*Correspondence to: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: 82-33-250-6454, Fax: 82-33-259-5565
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

능을 평가하였으며, 본 연구결과는 국내자생생물자원에 대한 유용성 정보를 제공하고 식품, 의약, 향장제품개발 등 고부가가치 생물산업 제품 및 소재로 활용 될 수 있는 기초적 자료로 제공될 수 있을 것으로 사료된다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 연구에서 사용된 갈참나무(*Quercus aliena* Blume) 잎은 2014년에 채집한 것으로 국립생물자원관으로부터 제공받았다. 인간섬유아세포(Human dermal fibroblast) 배양에 사용된 시약으로 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS) 및 trypsin-EDTA 등은 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, ascorbic acid, 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (H_2-DCFDA) 및 β-D-galactopyranoside (X-Gal)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

추출물 제조

갈참나무 잎의 추출물은 수용성 화합물과 지용성 화합물을 함께 추출하기 위하여 70%에탄올을 사용하였으며, 시료 100 g을 70% 에탄올 1,000 mL에 첨가한 후 침지시켜 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 상기 추출 과정을 3회 반복하고, 얻어진 추출액은 모두 합하여 filter paper (Whatman, No. 3, Maidstone, Kent, UK)로 여과한 후, 회전진공농축기(EYELA, N-3000, Tokyo, Japan)를 사용하여 감압농축한 후, 동결건조(Ilshinbiobase Co., Ltd, Yangju, Korea)하여 분말화 하였다.

피부 섬유아세포 배양

피부 섬유아세포(Human dermal fibroblast)는 American Type Culture Collection (ATCC, PCS-201-012, Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. 피부 섬유아세포는 실험목적에 따라 6-well 및 96-well plate에 각각 1×10^6 cells/well을 seeding한 후, FBS (10%) 및 P/S (1%)를 함유한 저농도 포도당 DMEM (89%)에서 24시간 배양하였다.

XTT assay를 이용한 세포독성 평가

피부 섬유아세포에 대한 갈참나무 잎 추출물의 세포독성 평가는 XTT {2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide innersalt} assay kit를 이용하여 측정하였다. 세포는 96-well plate에 1×10^6 cells/well을 seeding하여 24시간동안 배양하고, 갈참나무 잎 추출물을 각각 25, 50 및 100 μg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. XTT 및 PMS (N-methylphenazonium methyl sulfate) reagent를 이용하여 XTT working solution을 만들고, 각 well에 40 μL 씩 분주하여 CO_2 incubator에서 4시간 동안 반응한 후, microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm와 690 nm에서 각각 흡광도 값을 측정하였으며, 450 nm에서 측정된 흡광도 값에서 690 nm에서 측정된 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포독성을 계산하였다[10].

산화적 스트레스에 의한 세포 손상 보호효과 측정

산화적 스트레스 요인에 의한 세포 손상 보호효과는 XTT assay를 변형하여 측정하였다. 먼저 XTT assay와 마찬가지로 같은 양의 피부 섬유아세포를 24시간 동안 배양하여 부착시킨 뒤, 갈참나무 잎 추출물을 각각 25, 50 및 100 μg/mL의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 1 mM hydrogen peroxide를 1.5시간 동안 세포에 처리하였다. 이 후, 배지를 제거하고 각 well에 XTT working solution이 함유된 배지를 분주하여 CO_2 incubator에서 4시간 동안 반응 한 후, microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm와 690 nm에서 각각 흡광도 값을 측정하였으며, 450 nm에서 측정된 흡광도 값에서 690 nm에서 측정된 흡광도 값을 뺀 결과 값으로 세포보호효과를 계산하였다[11].

H_2-DCFDA assays를 이용한 산화적 스트레스 측정

산화적 스트레스를 측정하기 위해 Richard 등[12]의 H_2-DCFDA assay를 변형하여 측정하였다. 피부 섬유아세포를 cover glass가 들어가 있는 6-well plate에 1×10^6 cells/well을 seeding하고 24시간 동안 배양하여 부착시킨 후, 갈참나무 잎 추출물을 각각 25, 50 및 100 μg/mL의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 1 mM hydrogen peroxide를 1.5시간 동안 처리하여 산화적 스트레스를 유도하고 멸균된 PBS (pH 7.4)를 이용하여 2회 세척한 뒤, 10 μM H_2-DCFDA를 처리한 후 빛이 들어가지 않도록 주의하여 37°C에서 2시간 동안 반응 시킨 뒤 fluorescent microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 DCF (EX = 485 nm; Em = 525 nm)에 의한 세포내 형광값을 측정하였으며, Bradford protein assay 를 통하여 보정하였다. 또한 Gel/Mount를 이용하여 마운팅하고 역상현미경(Leica DM 300B, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다.

$$\text{DCF fluorescence intensity (\%)} = \frac{F_{Experiment}/P_{Experiment}}{F_{Control}/P_{Control}} \times 100$$

$F_{Experiment}$: 시료군 형광흡광도, $P_{Experiment}$: 시료군 단백질 농도
$F_{Control}$: 대조군 형광흡광도, $P_{Control}$: 대조군 단백질 농도

SA-β-galactosidase assay를 이용한 세포노화 측정

ROS에 의한 피부 섬유아세포의 노화를 측정하기 위해 β-galactosidase assay를 이용하였다[13]. 먼저 H_2-DCFDA assay와 마찬가지로 피부 섬유아세포를 24시간 동안 배양하여 부착시킨 뒤, 갈참나무 잎 추출물을 25, 50 및 100 μg/mL의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 0.5 mM hydrogen peroxide를 1.5시간 동안 처리하여 산화적 스트레스를 유도하고 hydrogen peroxide 제거 후, 5일간 배양한다. 세포고정을 위해 3.7% paraformaldehyde 용액 1 mL를 첨가하여 15분간 실온에서 방치한 후 paraformaldehyde 용액을 제거한 뒤, X-gal solution (1 mg/mL 5-bromo-4chloro-3-indolyl β-D-galactoside, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 2 mM magnesium chloride)을 처리하고 37°C에서 24시간 동안 배양하여 염색하였다. 염색된 세포는 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 통하여 염색된 세포 수를 측정하였다.

통계분석

모든 실험결과는 SAS (9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 통계분석하였다. 유의성 분석은 ANOVA 검정을 실시하였으며 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple rage test)으로 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

Results and Discussion

갈참나무 잎 추출물의 세포독성 평가

갈참나무 잎 추출물이 피부 섬유아세포의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 XTT assay 방법을 이용하였다. XTT assay는 대사가 활발한 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase 효소에 의해 XTT가 분열이 되면, 무색 또는 노란색에서 짙은 붉은색의 formazan을 생성하는 원리를 이용한 방법이다[14]. 피부 섬유아세포에 대한 갈참나무 잎 추출물의 세포독성 평가 결과는 Fig. 1과 같다. 갈참나무 잎 추출물은, 실험이 실시된 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았으며, 현미경 상에서 morphology의 변화도 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구에서는, 갈참나무 잎 추출물의 항산화 및 항노화 활성을 측정하기 위하여 세포독성을 나타내지 않은 25-100 μg/mL의 농도로 실험을 진행하였다.

Hydrogen peroxide로 유도된 세포손상에 대한 세포 보호효과

Hydrogen peroxide로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 갈참나무 잎 추출물이 피부 섬유아세포의 cell viability에 미치는 영향을 XTT assay로 측정하였고, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 피부 섬유아세포에 1 mM hydrogen peroxide으로 세포 손상을 유도하였을 때, 음성대조군이 control에 비해 80% 정도로 세포 생존율이 감소한 반면 갈참나무 잎 추출물 처리 군에서는 농도 의존적으로 산화적 스트레스 영향에 반하여 세포 생존율이 다시 증가하는 경향을 보였다. 특히 갈참나무 잎 추출물의 농도 50, 100 μg/mL에서

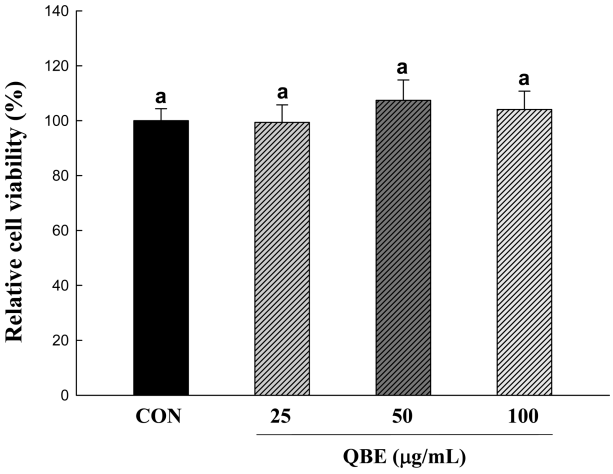

Fig. 1. Effect of QBE on cell viability. Cell viability of QBE was determined using XTT assay. Cells were divided into a non-treated and QBE-treated gourps. All values are presented as means ± SD. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

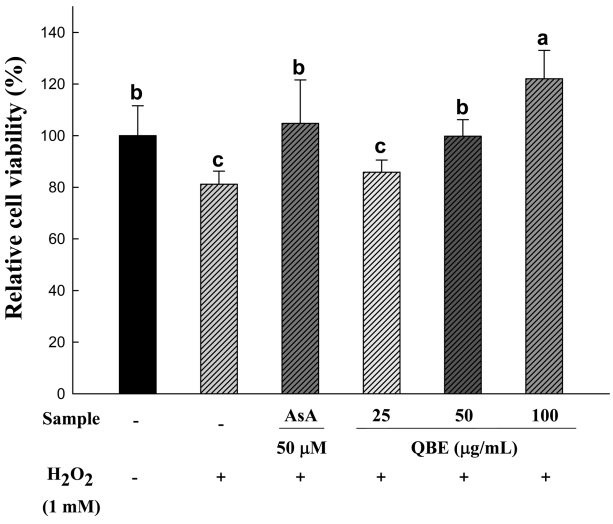

Fig. 2. Cell viability of QBE on H_2O_2-induced cell damage in human dermal fibroblasts (HDFs) cell system. Cells were divided into four groups. Control cells were non-treated, and other groups were exposed to 1 mM H_2O_2 for 2 h, 50 μM ascorbic acid (AsA) and QBE, respectively. HDFs were treated with 1 mM H_2O_2 and stained with XTT to present relative cell viability. All values are presented as means ± SD. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

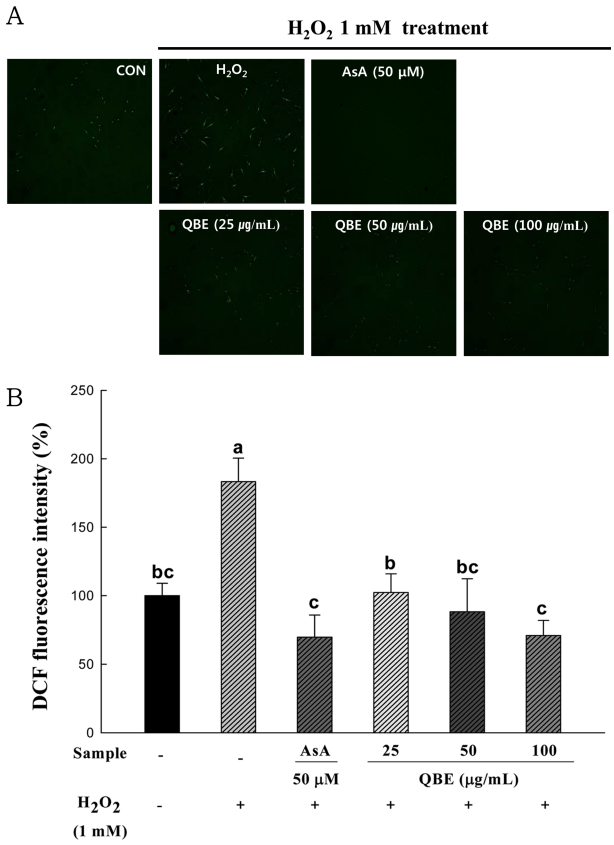

Fig. 3. Image of the intracellular ROS levels by fluorescence microscopy (a) and the relative fold increase of detected ROS (b). Intracellular ROS generation was measured using the H_2DCFDA method. Cells were divided into four groups. Control cells were non-treated, and other groups were exposed to 1 mM H_2O_2 for 2 h, 50 μM ascorbic acid (AsA) and QBE, respectively. All values are presented as means ± SD. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

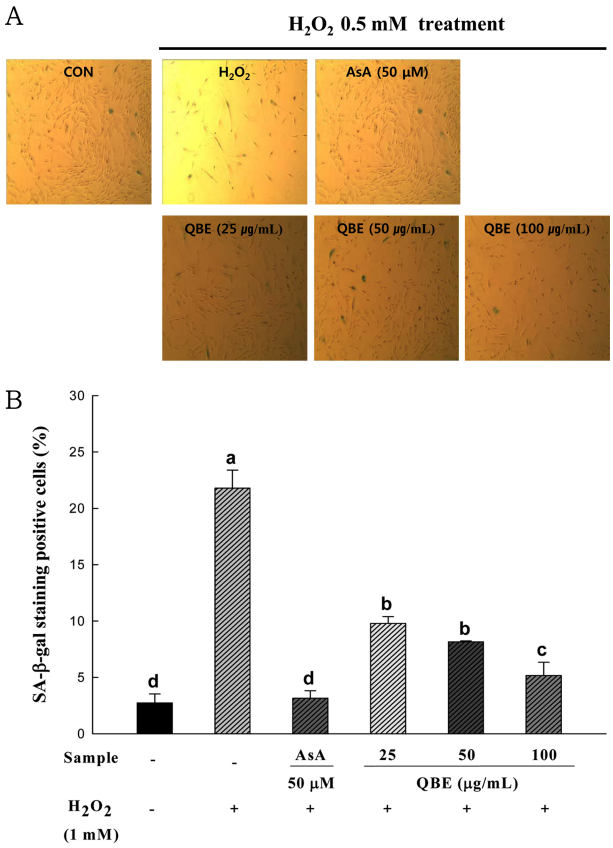

Fig. 4. Suppression effect of QBE on H_2O_2-induced expression of SA-β-galactosidase in HDFs. The photographic images (a) and the representative percentage of X-gal positive cells (b). All values are presented as means ± SD. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $P < 0.05$ by one-way ANOVA.

는 양성대조군으로 사용한 50 μM ascorbic acid 수준까지 세포를 보호하는 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 Phan 등[15]의 연구에서 항산화 활성 및 페놀성 물질이 세포 보호효과에 영향을 미친다는 것과 유사한 결과로 갈참나무 잎 추출물의 항산화활성 및 폴리페놀성 화합물 함량[9]과 관계있는 것으로 사료된다.

H_2-DCFDA 염색을 통한 세포내 항산화 효과

본 실험에서는 hydrogen peroxide로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 갈참나무 잎 추출물의 피부 섬유아세포 내 항산화력을 평가하기 위해 H_2-DCFDA 염색 방법으로 측정한 항산화활성은 Fig. 3과 같다. Hydrogen peroxide을 처리한 음성 대조군에서는 control에 비해 세포내 ROS 생성률이 약 180% 증가한 반면, 갈참나무 잎 추출물을 첨가한 시료군에서는 농도 의존적으로 세포내 ROS 생성이 감소함을 확인 하였다. 특히, 갈참나무 잎 추출물 100 μg/mL을 첨가한 시료에서는 양성 대조군인 ascorbic acid와 비슷한 수준의 항산화활성을 보였다. 이와 같은 결과는 갈참나무 잎 추출물의 다양한 항산화 활성 및 높은 폴리페놀 함량과 농도 의존적인 세포 보호 효과와 유사한 경향으로, 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하고 세포내 ROS 생성을 억제한 것으로 사료된다.

SA-β-galactosidase 염색을 통한 세포노화 억제 효과

활성산소종은 피부세포의 손상, 색소 침착의 원인 이며, 피부세포를 구성하는 지질, 단백질, 핵산, 효소 등에 직접적인 기능의 손실을 초래하여 피부노화를 유발한다[16,17]. 따라서 갈참나무 잎 추출물의 항산화 효과가 피부 섬유아세포 노화 억제에 미치는 영향을 확인하기 위하여 SA-β-galactosidase assay를 실시하였다. SA-β-galactosidase assay는 lactose 유사체인 X-gal이 β-galatosidase에 의해서 분해되면서 생성되는 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole에 의해 파란색으로 염색된 세포의 수를 비교하는 실험으로, 노화된 세포일수록 β-galactosidase의 발현이 높기 때문에 파란

색으로 염색된 세포수를 비교하여 노화의 진행정도를 확인할 수 있다[18]. Hydrogen peroxide을 처리한 음성 대조군에서는 전체 세포수에 비하여 염색된 세포수가 22%로 노화가 진행된 반면, 갈참나무 잎 추출물을 처리한 군에서는 농도 유의적으로 세포노화가 억제됨을 확인 하였다 (Fig. 4). 이러한 결과는 Yeom 등[19]의 연구에서 보고된 바와 같이 인삼 열매 추출물에 의해 피부세포에서 발생하는 활성 산소종 저감을 통하여 피부노화를 지연하고 개선한다는 연구결과와 유사한 경향을 보였다.

Acknowledgement

본 논문은 정부(환경부)의 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행하였으며(NIBR201726101), 2017년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구하였음(관리번호-520170541).

국문요약

본 연구는 예부터 약용으로 사용되었거나, 현재 식품공전에 식품원료로 사용이 가능한 것으로 등록된 국내 산림지역에 자생하는 식물을 식품산업에 활용하고자 선행연구에서 우수한 항산화 활성을 보인 갈참나무 잎을 본 연구에서 사용하였다. 70% 에탄올을 이용하여 추출한 갈참나무 잎을 이용하여, hydrogen peroxide로 산화적 스트레스를 유도한 피부 섬유아세포에서의 세포 보호효과, 세포내 항산화 효과 및 항노화 효과를 측정하였다. 세포 독성을 평가한 결과 25, 50 및 100 μg/mL의 갈참나무 잎 추출물을 처리하였을 때 모두 독성을 나타내지 않았으며, hydrogen peroxide로 산화적 스트레스를 유도한 상태에서는 세포를 보호하여 농도 유의적으로 세포생존율이 증가하였다. 특히, 100 μg/mL의 농도에서는 양성대조군으로 사용한 50 μM ascorbic acid 수준까지 세포 생존율이 증가하였다. 세포내 항산화 효과를 확인 하기위해 사용한 H_2-DCFDA assay에서는 형광현미경과 형광흡광도 측정에서 모두 농도 유의적으로 세포내 ROS 저감 활성을 확인하였고 갈참나무 잎 추출물을 100 μg/mL 농도로 처리했을 때는 50 μM ascorbic acid와 비슷한 세포내 항산화 효과를 나타내었다. 또한 SA-β-galactosidase assay를 이용한 갈참나무 잎 추출물의 피부 섬유아세포에 대한 항노화활성은 ROS 생성 억제 효과와 유사한 경향으로 갈참나무 잎 추출물의 농도 유의적으로 세포 노화 억제효과를 확인하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 갈참나무 잎 추출물이 hydrogen peroxide로 인한 산화적 스트레스 상태에서 세포 보호효과, 항산화 효과 및 항노화 효과가 관찰되어 기능성 식품원료로서의 활용도가 매우 넓을 것으로 판단된다.

References

1. Kruk, J., Ewa, D.: Oxidative stress and skin diseases: possible role of physical activity. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 561-568 (2014).
2. Cavinato, M., Jansen-Dürr, P.: Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp. Gerontol.* **94**, 78-82 (2017).
3. Droge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95 (2002).
4. Harman, D.: Free radical theory of aging. *Mutat. Res.* **275**, 257-266 (1992).
5. Kim, H.S., Im, N.R., Park, J.H., Kim, M.O., Park, S.N.: Antioxidative effect and active component analysis of *Gnaphalium affine* D. DON. Extracts. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.* **40**, 11-20 (2014).
6. Kang, M.H., Choi, C.S., Kim, Z.S., Chung, H.K., Min, K.S., Park, C.G., Park, H.W.: Antioxidative Activities of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of Crotalaria *sessiflora* L.. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 1098-1102 (2002).
7. Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S.: Modifying effects of antioxidants on chemical carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* **14**, 315-323 (1986).
8. Choi, S.I., Lee, J.S., Lee, S., Lee, H.J., Kim, B.J., Yeo, J., Jung, T.D., Cho, B.Y., Choi, S.H., Lee, J.H., Kim, J.Y., Lee, O.H.: Antioxidant and anti-aging effects of extracts from leaves of *Castanea crenata* Siebold & Zucc. in human dermal fibroblast. *J. Food Hyg. Saf.* **32**, 243-248 (2017).
9. Cho, M.L., Lee, J.S., Lee, S., Son, Y.K., Bae, C.H., Yeo, J., Lee, H.S., Ma, J.G., Lee, O.H., Kim, J.Y.: Antioxidant activity of 11 species in Korean native forest plants. *Korean J. Food Nutr.* **25**, 1098-1106 (2015).
10. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I.: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752-1761 (2004).
11. Kim, D.B., Shin, G.H., Kim, J.M., Kim, Y.H., Lee, J.H., Lee, J.S., Song H.J., Choe S.Y., Park I.J., Cho J.H., Lee, O.H.: Antioxidant and anti-ageing activities of citrus-based juice mixture. *Food Chem*. **194**, 920-927 (2016).
12. Richard, D., Kefi, K., Barbe, U., Bausero, P., Visioli, F.: Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol. Res.* **57**, 451-455 (2008).
13. Choi, S.I., Lee, J.H., Kim, J.M., Jung, T.D., Cho, B.Y., Choi, S.H., Lee, D.W., Kim, J.K., Kim, J.Y., Lee, O. H.: *Ulmus macrocarpa* Hance Extracts Attenuated H_2O_2 and UVB-Induced Skin Photo-Aging by Activating Antioxidant Enzymes and Inhibiting MAPK Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1200 (2017).
14. Ansel, J.L., Lupo, E., Mijouin, L., Guillot, S., Butaud, J.F., Ho, R., Lecellier, G., Raharivelomanana, P., Pichon, C.: Biological activity of Polynesian *Calophyllum inophyllum* oil

extract on human skin cells. *Planta Med.* **82**, 961-966 (2016).
15. Phan, T.T., Wang, L., See, P., Grayer, R.J., Chan, S.Y., Lee, S.T.: Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 1373-1379 (2001).
16. Harman, D.: The free radical theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.,* **5**, 557-561 (2003).
17. Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* **92**, 9363-9367 (1995).
18. Yoon, Y., Choi, S.J., Park, W.J., Eom, S.Y., Lee, S.K., An, I.S.: The protective effect of extracts of *Bifidobacterium longum* against ultraviolet B in human dermal fibroblasts. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **10**, 887-891 (2012).
19. Yeom, M.H., Lee, J.Y., Kim, J.S., Park, C.W., Kim, D.H., Kim, H.K.: The anti-aging effects of Korean ginseng berry in the skin. *Kor. J Pharmacogn.* **41**, 26-30 (2010).