pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 3, pp. 243~248 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.3.243

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

피부 섬유아세포에서 밤나무 잎 추출물의 항산화 및 항노화 효능

최선일 · 이종석[1] · 이사라[1] · 이혜진[1] · 김병직[1] · 여주홍[1] · 정태동 · 조봉연 · 최승현 · 이진하 · 김종예 · 이옥환*
강원대학교 식품생명공학과, [1]국립생물자원관

Antioxidant and Anti-aging Effects of Extracts from Leaves of *Castanea crenata* Siebold & Zucc. in Human Dermal Fibroblast

Sun-Il Choi, Jong Seok Lee[1], Sarah Lee[1], Hye Jin Lee[1], Byung-Jik Kim[1], Joohong Yeo[1], Tae-Dong Jung, Bong-Yeon Cho, Seung-Hyun Choi, Jin-Ha Lee, Jong-Yea 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 April 17, 2017/Revised May 4, 2017/Accepted May 29, 2017)

ABSTRACT - Intracellular and extracellular oxidative stress initiated by reactive oxygen species (ROS) causes skin aging, which is characterized by wrinkles and atypical pigmentation. Use of antioxidant is an effective approach to prevent symptoms related to ROS-induced aging of the skin. Therefore, the antioxidant and anti-aging effect of *Castanea crenata* Siebold & Zucc. extracts (LCE) was investigated in this study. The LCE markedly reduced the hydrogen peroxide-induced cell damage, intracellular ROS, and oxidative stress-induced senescence in human dermal fibroblasts (HDFs). These results indicate that LCE might have beneficial effects on oxidative stress-induced damage and thus reduce skin aging.

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

피부는 신체의 가장 바깥쪽에 위치하며 외부로부터 신체를 보호하는 역할을 하기 때문에 신체 내외부적으로 다양한 스트레스에 노출되어 노화 및 각종 질병을 일으킨다. 노화와 질병을 일으키는 원인은 다양하지만 가장 광범위하게 적용되는 원인은 활성산소종의 축적이며, 이로 인해 세포손상이 시작된다[1,2]. 생명유지에 필요한 에너지를 얻는 호흡과정은 반드시 필요하지만 이 과정에서 흡입한 산소 중 일부가 활성산소로 전환된다. 또한 비타민D 합성, 살균 작용, 혈액순환 촉진 등 자외선을 쬐는 것이 필요하지만 지나치게 자외선에 영향을 받으면 활성산소가 생성되어 피부의 면역기능을 억제시키고, 염증을 유발하여 탄력 감소, 주름, 기미, 주근깨, 피부암 등의 피부질환 및 비만, 당뇨, 뇌혈관 질환, 심장병, 고혈압 등의 만성퇴행성 질환의 원인이 된다[3-5]. 이러한 대사과정 중 생성되는 활성산소종은 슈퍼옥사이드(superoxide, O_2^-), 일중항 산소(singlet oxygen, $^1O_2$), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2) 등이 포함되며 이들은 불안정하고 반응성이 매우 높아서 체내에 과량 존재할 경우 세포의 주요 구성 성분인 지질, 단백질, DNA 등의 손상을 일으켜 산화적 스트레스를 유발하게 된다[6,7].

밤나무(*Castanea crenata* Siebold & Zucc.)는 참나무과에 속하는 낙엽교목으로 우리나라 전지역에 걸쳐 널리 자생 또는 재배되고 있는 식물로 주로 열매의 주성분인 전분만을 식용하고 있으며, 실험적으로는 밤나무 잎으로부터 차를 제조한 경우가 있었지만 대중적인 인기를 얻지 못하고 있다[8]. 밤나무 잎은 gallic acid, methyl gallate, catechin, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin, epigallocatechin gallate등을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며[9], 효능으로는 항균 활성[10], 항미생물 효과[11], 항알레르기 효과[12], 항산화 효과[13] 등의 연구가 보고되고 있다.

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. 본 연구팀은 전보[14]에서 국내 자생식물 45종을 국립생물자원관으로부터 제공받아 항산화 활성 등을 평가하였다. 현재까지 국내 산림지역 자생 식물을 이용하여 열

*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

매를 제외한 잎, 줄기 및 잔가지 추출물의 항산화 및 항노화 활성에 관한 연구는 많지 않고 이를 식품가공 원료로 적용한 연구도 초기단계에 불과하다. 따라서 전보[14]에서 국내 산림지역 자생식물 중 항산화활성이 우수하였던 밤나무의 잎 부분을 70% 에탄올로 추출하여 피부 섬유아세포에서 항산화 및 항노화 효능을 평가하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

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

추출물 제조

밤나무 잎의 추출은 수용성 화합물과 지용성 화합물을 함께 추출하기 위하여 70% 에탄올을 사용하였으며, 각 시료 137.5 g을 70% 에탄올 1 L에 침지시킨 후 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 상기 추출 과정을 3회 반복하고, 얻어진 추출액은 모두 합하여 filter paper (Whatman, No. 3, Maidstone, Kent, UK)로 여과한 후, 진공회전농축기 (EYELA, N-3000, Tokyo, Japan)를 사용하여 감압농축한 후, 동결건조(Ilshinbiobase Co., Ltd, Yangju, Korea)하였다. 동결건조 후 얻어진 추출물은 10.58 g으로 7.69%의 수율을 수득하였다.

피부 섬유아세포 배양 및 분화

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. 이 때, 밤나무 잎 추출물의 효과를 관찰하기 각각 25, 50 및 100 μg/mL로 처리하였고, 양성 대조군에는 항산제인 ascorbic acid 50 μM을 처리하여 비교하였다.

XTT assay를 이용한 세포독성 평가

피부 섬유아세포에 대한 밤나무 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, 밤나무 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 well 40 μL 씩 분주하여 CO_2 incubator에서 4시간 동안 반응한 후, microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도값을 뺀 결과 값으로 세포 독성을 측정하였다[15].

산화적 스트레스에 의한 세포 손상 보호효과 측정

산화적 스트레스 요인에 의한 세포 손상 보호효과는 XTT assay를 변형하여 측정하였다. 먼저 피부 섬유아세포를 96-well plate에 1×10^6 cells/well을 seeding하고 24시간 동안 배양하여 부착시킨 뒤, 밤나무 잎 추출물을 각각 25, 50 및 100 μg/mL의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 다음 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 1 mM hydrogen peroxide를 1.5시간 동안 세포에 처리하였다. 이후, 배지를 제거하고 각 well에 XTT working solution이 함유된 배지를 분주하여 CO_2 incubator에서 4시간 동안 반응한 후, microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm 흡광도 값에서 690 nm의 흡광도값을 뺀 결과 값으로 세포 독성을 측정하였다.

H_2-DCFDA assays를 이용한 산화적 스트레스 측정

산화적 스트레스를 측정하기 위해 H_2-DCFDA assay를 이용하였다. 피부 섬유아세포를 cover glass가 들어가 있는 6-well plate에 1×10^6 cells/well을 seeding하고 24시간 동안 배양하여 부착시킨 후, 밤나무 잎 추출물을 각각 25, 50 및 100 μg/mL의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 1 mM hydrogen peroxide를 1.5시간동안 처리하여 산화적 스트레스를 유도하고 멸균된 PBS (pH 7.4)를 이용하여 2회 세척한 뒤, 세포고정을 위해 3.7% para-formaldehyde 용액 1 mL를 첨가하여 15분간 실온에서 방치한 뒤 제거하였다. 10 μM H_2-DCFDA를 처리한 후 빛이 들어가지 않도록 주의하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 Gel/Mount를 이용하여 마운팅하고 역상현미경 (Leica DM 300B, Wetzlar, Germany)로 관찰하였다. 또한 fluorescent microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 DCF (EX = 485 nm; Em = 525 nm)에 의한 세포내 형광값을 측정하였다.

SA-β-galactosidase assay를 이용한 세포노화 측정

ROS에 의한 피부 섬유아세포의 노화를 측정하기 위해 β-galactosidase assay를 이용하였다. 피부 섬유아세포를 6-

well plate에 1×10^6 cells/well을 분주하여 24시간 동안 배양하여 부착시킨 후, 밤나무 잎 추출물을 각각 25, 50 및 100 μg/mL의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. Hydrogen peroxide (0.5 mM)를 1.5시간동안 처리하여 산화적 스트레스를 유도하고 hydrogen peroxide 제거 후, 5일간 배양한다. 세포고정을 위해 3.7% paraformaldehyde 용액 1 mL를 첨가하여 15분간 실온에서 방치한 뒤 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

밤나무 잎 추출물의 세포독성 평가

XTT assay는 대사가 활발한 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase 효소에 의해 XTT가 분열이 되면 짙은 색의 formazan을 생성하는 원리를 이용한 방법으로[16], 밤나무 잎 추출물이 피부 섬유아세포의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 밤나무 잎 추출물을 농도별로 처리하고 XTT assay 방법으로 세포의 생존율을 측정하였다. 밤나무 잎 추출물은 25, 50 및 100 μg/mL의 농도로 피부 섬유아세포에 처리하였으며, 모든 농도의 추출물에서 세포 내 독성을 보이지 않았고 현미경 상에서 morphology의 변화도 관찰되지 않았다(Fig. 1). 따라서 본 연구에서는 밤나무 잎 추출물의 세포 보호효과, 항산화 활성 측정 및 노화 억제 효과를 측정하기 위하여 25, 50 및 100 μg/mL 농도를 이용하여 실험을 진행하였다.

Hydrogen peroxide로 유도된 세포손상에 대한 세포 보호효과

밤나무 잎 추출물이 hydrogen peroxide로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 피부 섬유아세포의 생존율에 미치는 영향을 XTT assay로 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. Control을 제외한 모든 피부 섬유아세포에 1 mM hydrogen peroxide를 처리하여 산화적 스트레스를 유도 하였으며, 음성 대조군에서는 control에 비하여 80% 정도로 세포 생존율이 감소한 반면, 밤나무 잎 추출물 처리 군에서는 농도 유의적으로 세포 생존율이 다시 증가하는 경향을 보였다. 특히 밤나무 잎 추출물의 농도 100 μg/mL에서는 양성대조군으로 사용한 50 μM ascorbic acid 수준까지 세포를 보호하는 효과를 나타내었다. 본 연구팀의 전보[14]에서 밤나무 잎 추출물의 항산화 활성을 DPPH 및 ABTS 라디칼

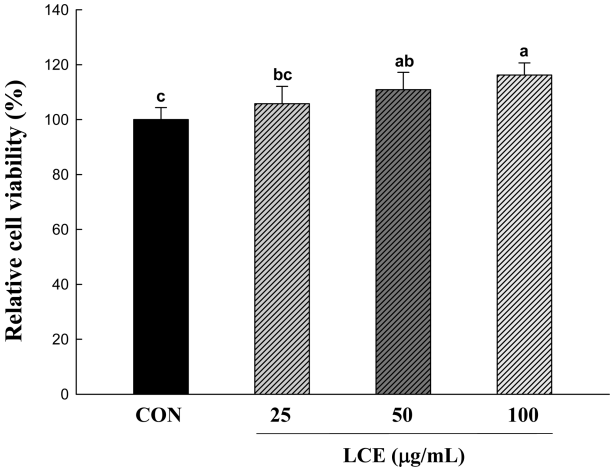

Fig. 1. Effects of leaves of *Castanea crenata* Siebold & Zucc. extracts (LCE) on cell viability. Cell viability was measured by XTT assay. The exponentially growing cells were plated into 96-well plates at a density of 1×10^6 cells/well in DMEM/FBS medium and incubated for 24 hr prior to treatment at 37°C in 5% CO_2. Cells were divided into a control group and a treatment groups. Each value is the mean ± SD. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

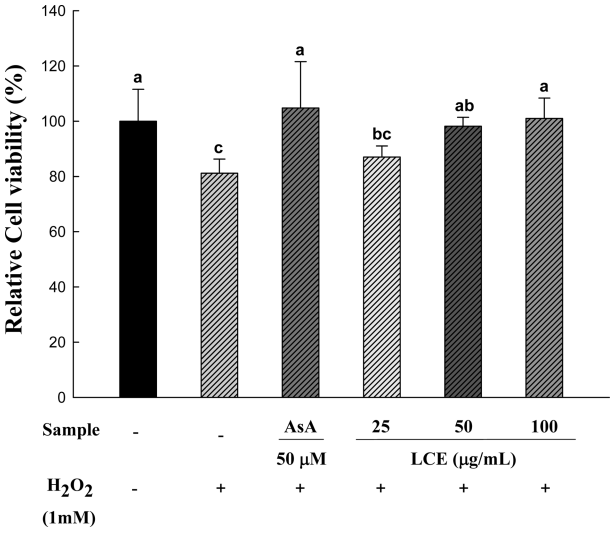

Fig. 2. Cell viability on H_2O_2-induced cell damage in human dermal fibroblasts (HDFs) cell system. HDFs were treated with 1 mM H_2O_2 and stained with XTT to show survival cells compared to non-treated group. All values are presented as means ± SD. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

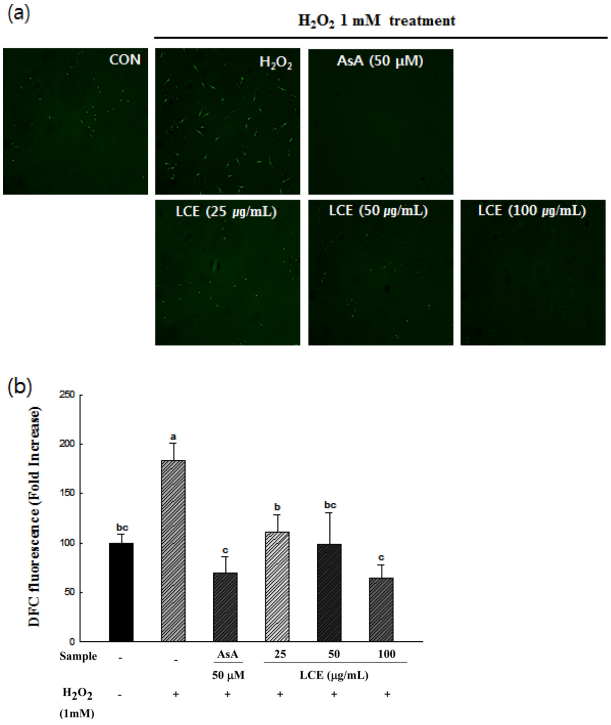

Fig. 3. Intracellular reactive oxygen species (ROS) generation in human dermal fibroblasts (HDFs) treated with leaves of *Castanea crenata* Siebold & Zucc. extracts (LCE) or H_2O_2. Image of the intracellular ROS levels by fluorescence microscopy (a) and the relative fold increase of detected ROS (b). Intracellular ROS generation was measured using the H_2DCFDA method. Cell was exposed to LCE for 24 h, then 1 mM H_2O_2 for 2 h. 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.

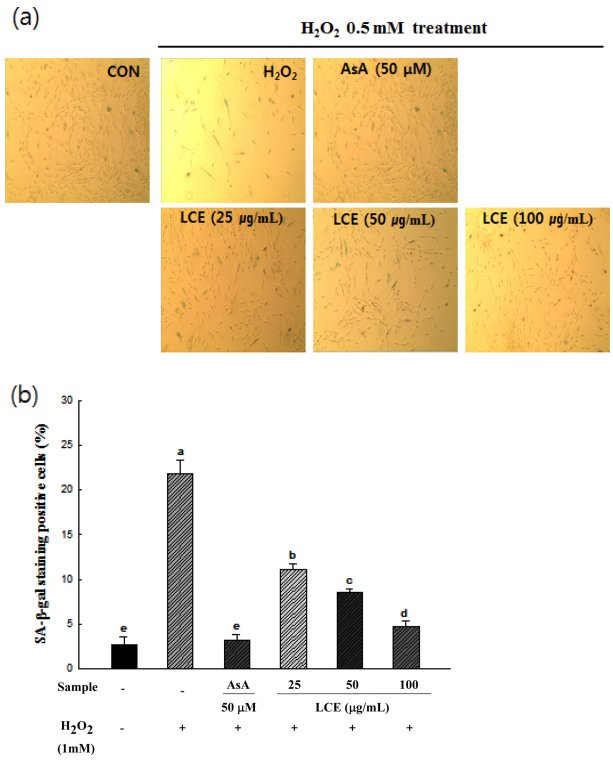

Fig. 4. The suppressible effect of Leaves of *Castanea crenata* Siebold & Zucc. extracts (LCE) on H_2O_2-induced expression of SA-β-galactosidase in HDFs. SA-β-galactosidase expression by H_2O_2-treated cells in control, LCE-treated cells. The photographic images (a) and the representative percentage 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.

소거능, reducing power, NO 라디칼 소거능 및 ORAC 활성을 측정하였고, 우수한 항산화 활성 확인하였다. 또한 높은 총 폴리페놀(429.11 ± 9.58 mg GAE/g), 플라보노이드(47.90 ± 0.92 mg QE/g) 및 프로안토시아니딘(160.67 ± 4.55 μg CE/g)함량을 보고하였으며, Kim 등[17]의 연구에서 항산화 활성 및 페놀성 물질이 세포 보호효과에 영향을 미친다는 것과 유사한 결과로 밤나무 잎 추출물이 높은 세포 보호효과를 나타낸 것으로 사료된다.

H_2-DCFDA 염색을 통한 세포내 항산화 효과

DCF-DA는 세포막을 통해 확산되며 세포내 esterase에 의해 효소적으로 가수분해 되어 비형광성 DCF-H가 되며, 세포내 ROS가 존재할 경우 매우 빠르게 높은 형광을 띈 DCF로 산화되는 원리를 이용한 방법이다[18]. 밤나무 잎 추출물이 hydrogen peroxide로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 피부 섬유아세포내의 항산화 효과를 알아보기 위하여 밤나무 잎 추출물을 농도별로 처리하고 H_2-DCFDA 염색 방법으로 세포내 항산화 효과를 측정하였으며, 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. Control을 제외한 모든 피부 섬유아세포에 1 mM hydrogen peroxide를 처리하여 산화적 스트레스를 유도 하였으며, 음성 대조군에서는 control에 비하여 세포내 ROS 생성이 180%로 증가한 반면, 25, 50 및 100 μg/mL의 밤나무 잎 추출물 처리 시 각각 111%, 98% 및 64%로 산화적 스트레스로 증가했던 ROS가 밤나무 잎 추출물 처리로 세포내 ROS 효과적으로 감소함을 확인하였다. 이와 같은 결과는 세포 보호효과와 유사한 경향으로, 밤나무 잎 추출물이 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하여 세포내 ROS 생성을 억제한 것으로 사료된다.

SA-β-galactosidase 염색을 통한 세포노화 억제 효과

활성 산소는 피부세포를 구성하는 지질, 단백질, 핵산, 효소 등에 산화적 손상을 주며, 이러한 산화 반응 산물은 노화의 원인으로 작용하여 조직의 손상, 진피의 구성성분 감소, 표피의 각질화 등을 유발하게 된다[19]. X-gal은 lactose의 유사체로서 β-galactosidase에 의해서 galactose와 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole로 분해되며, 분해된 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole은 dimer를 형성하여 파란색을 띄게

되며, β-galactosidase는 노화가 진행된 세포에서 발현량이 많아진다[20]. 피부 섬유아세포에 hydrogen peroxide로 산화적 세포노화를 유도하고 밤나무 잎 추출물을 농도별로 처리하여 항노화 효과를 측정하였으며, 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. Hydrogen peroxide (0.5 mM) 처리한 군에서 전체 세포수에 비하여 염색된 세포의 수가 21% 증가로 노화가 진행된 반면, 25, 50 및 100 μg/mL의 밤나무 잎 추출물 처리 시 각각 11%, 8% 및 4%로 세포노화가 효과적으로 억제됨을 확인하였다. 이와 같은 결과는 Oh 등[21]의 연구에서 세포의 활성 산소를 감소시켜 세포 손상을 방어하고 세포의 노화를 억제한다는 연구결과와 일치하였다.

Acknowledgement

본 논문은 정부(환경부)의 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행하였습니다(NIBR201726101).

국문요약

현재 식품공전에 식품원료로 사용이 가능한 것으로 등록된 국내 산림지역 자생 식물을 식품산업에 활용하고자 국내 자생식물 45종을 선별하였고, 본 연구팀의 선행연구에서 45종의 항산화 활성을 평가한 결과, 다른 종들과 비교하여 우수한 항산화 활성을 보인 밤나무 잎을 본 연구에서 사용하였다. 본 연구에서는 hydrogen peroxide로 산화적 스트레스를 유도한 상태에서 밤나무 잎 추출물의 세포 보호효과, 세포내 항산화 효과 및 항노화 효과를 관찰하였다. 세포 보호효과를 측정한 결과 밤나무 잎 추출물의 농도 유의적으로 세포를 보호하는 효과를 확인하였고, 특히 100 μg/mL에서는 양성대조군으로 사용한 항산화 물질인 ascorbic acid 수준까지 세포를 보호하는 효과를 나타내었다. H_2-DCFDA 염색을 통한 세포내 항산화 효과를 확인한 결과, 형광현미경과 형광흡광도 측정에서 모두 밤나무 잎 추출물이 농도 유의적으로 세포내 ROS를 저감을 확인하였고, 세포 보호효과와 마찬가지로 농도 100 μg/mL에서는 ascorbic acid와 비슷한 수준을 보였다. SA-β-galactosidase 염색을 통하여 관찰한 세포노화 억제 효과는 ROS 생성 억제 효과와 유사한 경향으로 밤나무 잎 추출물의 농도 유의적으로 세포노화 억제를 관찰되었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 밤나무 잎 추출물은 산화적 스트레스로 인한 세포노화를 억제하는 효능을 보였으며, 이는 천연물에서 유래한 항산화 및 항노화 활성 첨가제로 활용도가 매우 넓을 것으로 판단된다.

References

1. Chung, H.Y., Sung, B., Jung, K.J., Zou, Y., Yu, B.P.: The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid. Redox Sign.,* **8**, 572-581 (2006).
2. Lee, S.H., Hong, L.J., Park, H.G., Ju, S.S., Kim, G.T.: Functional characteristics from the barley leaves and its antioxidant mixture. *J. Appl. Biol. Chem.,* **46**, 333-337 (2003).
3. Imokawa, G.: Mechanism of UVB-induced wrinkling of the skin: paracrine cytokine linkage between keratinocytes and fibroblasts leading to the stimulation of elastase. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.,* **14**, 36-43 (2009).
4. Droge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.,* **82**, 47-95 (2002).
5. Harman, D.: Free radical theory of aging. *Mutat. Res.,* **275**, 257-266 (1992).
6. Halliwell, B., Aeschbach, R., Lliger, J., Aruoma, O.I.: The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.,* **33**, 601-617 (1995).
7. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.,* **39**, 44-84 (2007).
8. Jang, M.J., Jun, D.H., Kim, S.H., Han, S.I., Lee, J.T.: Anti-wrinkle Effect of Chestnut Leaf. *J. Life Sci.,* **23**, 751-756 (2013).
9. Choi, S.W., Kim, H.J.: Inhibitioin of tyrosinase activity by polyphenols of chestnut leaf. *HSJAS.,* **6**, 321-327 (1998).
10. Choi, O.B.: Active compounds and antimicrobial effects from *castanea crenata* leaf. *Korean J. Food Nutr.,* **18**, 367-372 (2005).
11. Choi, O.B., Kim, K.M., Yoo, G.S., Park, K.H.: Anti-allergic effects of *castanea crenata* leaf tea. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **30**, 468-471 (1998).
12. Choi, Y.H., Kim, J.H., Kim, M.J., Han, S.S., Rim, Y.S.: Antioxidative compounds in leaves of *castanea crenata* s. et z. *Korean J. Med. Crop Sci.,* **8**, 373-377 (2000).
13. Choi, O.B., Yoo, G.S., Park, K.H.: Antioxidative and antimicrobial effects of water extracts with *castanea crenata* leaf tea. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **31**, 1128-1131 (1999).
14. 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).
15. 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).
16. Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L.: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods.,* **142**, 257-265, (1991).
17. Kim, D.B., Oh, J.W., Lee, J.S., Kim, Y.H., Park, I.J., Cho, J.H., Lee, O.H.: Antioxidant activities of green and purple kohlrabi juices. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **46**, 601-608, (2014).
18. Lee, Y.H., Ho, J.N., Dong, M.S., Park, J.H., Kim, H.K.,

Hong, B.S., Shin, D.H., Cho, H.Y.: Transfected HepG2 cells for evaluation of catechin effects on alcohol-induced CYP2E1 cytotoxicity. *J. Microbiol. Biotechnol.,* **15**, 1310-1316, (2005).

19. 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. U.S.A*. **92**, 9363-9367 (1995).
20. Kim, N.M., Koo, B.S., Lee, S.K., Hwang, E.I., So, S.H., Do, J.H.: Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and MMP-I activity in human dermal fibroblast. *J. Ginsen Res.,* **31**, 86-92 (2007).
21. Oh, J.Y., Kim, J.H., Lee, G.S., Zhang, Y.H., Pyo, H.B.: Antioxidative and Anti-aging Effects of Extract from *Talinum paniculatum*. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.,* **39**, 313-322 (2013).