

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 探討淡水生綠藻萃出物於延緩光照皮膚老化的應用及生物 分子原理 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 97-2320-B-041-004-  
執行期間：97年08月01日至98年07月31日  
執行單位：嘉南藥理科技大學藥學系

計畫主持人：施美份  
共同主持人：程中玉、沈家瑞、陳莉螢  
計畫參與人員：此計畫無其他參與人員

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 98 年 10 月 16 日

## 研究計畫之背景及目的：

日照紫外線的暴露引起的皮膚細胞的傷害，進而影響到皮膚的緊縮性及彈性，並且誘發皮膚提前老化現象：包括有皮膚粗糙、皺紋、斑點、皮膚鬆弛、及色澤暗沉等，這些皮膚變化也常被認知為光照老化現象（*photoaging*）。正常的皮膚是靠細胞外基質（*extracellular matrix*）生合成及分解的平衡維持，而 *Matrix metalloproteinases*（*MMPs*）則在維護細胞外基質（*extracellular matrix*）的重塑（*remodeling*）上扮演著重要角色，其中含量最豐富的一種蛋白質為 *type I* 膠原蛋白（*type I collagens*），其功能與維護皮膚強度及彈性有關。*type I* 膠原蛋白主要是由纖維母細胞（*fibroblast*）所製造，首先會先形成可溶性的前趨膠原蛋白（*procollagen*），被釋放後再經適度分解則形成不溶性的膠原蛋白纖維。膠原蛋白的生命週期預估約有一年之久（*Verzijl et al., 2000*），因光照所引起任何造成膠原蛋白排列雜亂、片段化、或成束沉積現象都是一種皮膚老化現象（*Fisher et al., 1996; 1997; Talwar et al., 1995*）。

皮膚及眼睛是人類唯一暴露到日光紫外線的部位。紫外線的波長可分四段：*UVC* (<290nm), *UVB* (290-320nm), *UVA2* (320-340nm), and *UVA1* (340-400nm)。其中 *UVB* 所引起的皮膚機能的傷害主要是皮膚老化及癌症，*UVA2* 的穿透能力較 *UVA1* 強，因此也是引起皮膚老化的主要波長之一。紫外線引起的皮膚變化已知是一種氧化性傷害藉由活化細胞內的 *protein kinase C*（*PKC*）的活性，*PKC* 的活性增加的結果便促進 *Interstitial collagenase*（如 *MMP-1*）生合及造成膠原蛋白的分解（*Berneburg et al, 1999*）。*MMPs* 分解含 *type I* 及 *III* 膠原蛋白的細胞外纖維。而 *MMP-3* (*stromelysin-1*) 則是負責分解醣蛋白 *proteoglycans*、*fibronectin* 和 *type III* 膠原（*Giambernardi et al, 1998; Kuroda & Shinkai 1997*）。組織中可以與 *MMPs* 的活性相抗衡的物質則是 *tissue inhibitor of metalloproteinase*（*TIMP*）。因此任何的因子會造成 *MMPs* 的活性增加或 *TIMPs* 的活性時不足皆會引起皮膚的

變化，如失去彈性、皺紋的產生 (Talwar *et al.*, 1995)。

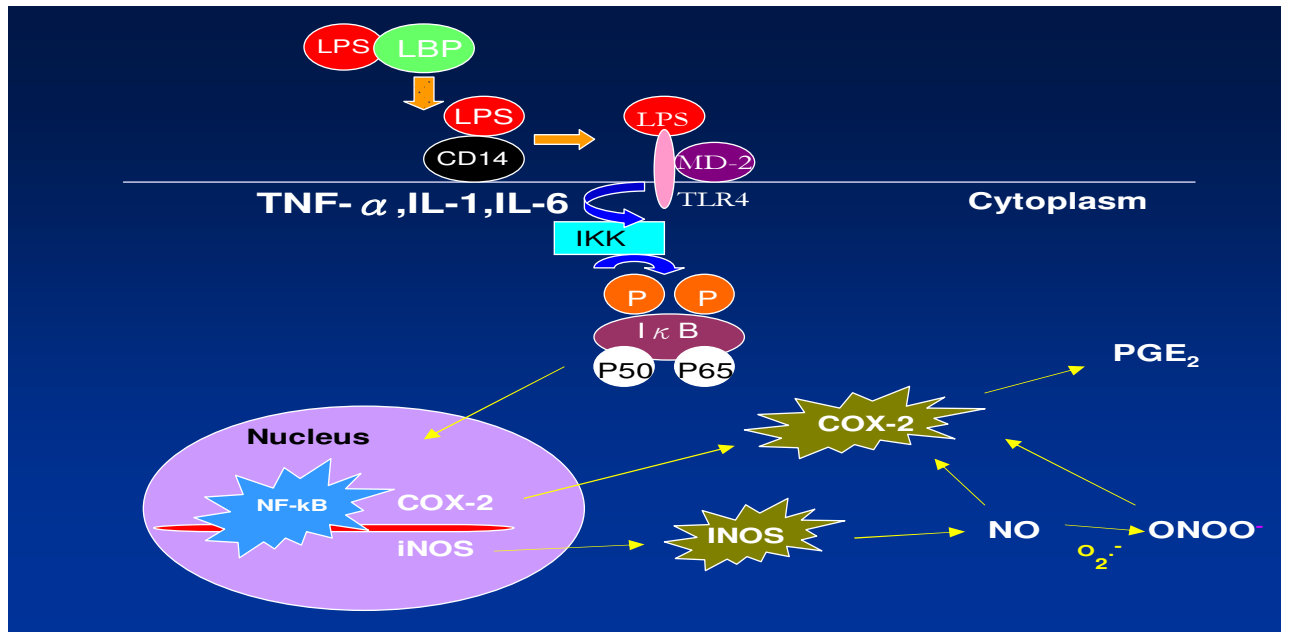
皮膚老化的特色包括皺紋及長期紫外線照射所引起的日曬雀斑，後者也常被認知為光照老化現象 (photoaging)。許多研究證實光照輻射 (UV irradiation) 所引起的皮膚老化現象與細胞外基質 (extracellular matrix)，如膠原蛋白 (collagen)、彈性蛋白 (elastin)、proteoglycans 的組成改變或是水解有關 (Fisher *et al.*, 1997; Krutmann, 2001; Varani *et al.*, 2001)。這些改變進而被認為與刺激訊息傳遞路徑 (signal transduction pathways) 進而活化轉錄因子 (transcription factor) 及標的基因 (target gene) (Fisher *et al.*, 1998)。UV 照射活化 MAP kinase 訊息路徑接著誘發轉錄因子 AP1，然後引發 MMP 水解酵素的基因表現並進行製造這些水解酵素，接著出現分解細胞外基質 (extracellular matrix) 的結果 (Fisher *et al.*, 1996; 2000)。

許多研究證實光照輻射 (UV irradiation) 所引起的皮膚老化現象與細胞外基質 (extracellular matrix)，如膠原蛋白 (collagen)、彈性蛋白 (elastin)、proteoglycans 的組成改變或是水解有關 (Fisher *et al.*, 1997; Krutmann, 2001; Varani *et al.*, 2001)。這些改變進而被認為與刺激訊息傳遞路徑 (signal transduction pathways) 進而活化轉錄因子 (transcription factor) 及標的基因 (target gene) 有關 (Fisher *et al.*, 1998)。UV 照射活化 MAP kinase 訊息路徑接著誘發轉錄因子 AP1，然後引發 MMP 水解酵素的基因表現並大量進行製造這些水解酵素，接著出現分解細胞外基質 (extracellular matrix) 的結果 (Fisher *et al.*, 1996; 2000)。UVA 誘導的肌膚老化過程藉由增加 MMP1 水解細胞外基質 (extracellular matrix) 的 collagen 已知與 PCK、MAP kinase、AP1 轉錄因子 (transcription factors) 路徑有關 (Watanabe *et al.*, 2004)。路徑中又以 migration inhibitory factor (MIF) 及 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 所參與的角色與皮膚纖維母細胞經 UVA 照射後所增加的 MMP 的相關性最為密切 (Watanabe *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2003)。TGF- $\beta$  是一種無處

不存在的多功能性細胞激素 (cytokine)，兼具調節細胞增生和分化、組織重塑 (tissue remodeling) 及組織修護等功能 (Massague, 1998)。TGF- $\beta$  先與 TGF- $\beta$  type II receptor (TbRII) 結合然後與 TbRI 形成複合體，接著磷酸化轉錄因子 Smad2 和 Smad3 然後再與 Smad4 結合並轉移進入細胞核內促進標的基因的表現，Type I 膠原蛋白基因表現即是 TGF- $\beta$  所調解的其中一種基因 (Ghosh *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Akagi *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1990; Slack *et al.*, 1993)；在缺乏 TbRII 的形況下，TGF- $\beta$  是無法與 TbRI 作用 (Wrana *et al.*, 1992)。UV 輻射作用下會造成 TbRII 的蛋白質及 mRNA 表現減少 (Quan *et al.*, 2001; Gambichler *et al.*, 2007)，這些作用是經由降低 Smad3 mRNA 的表現 (Kreuter *et al.*, 2006; Gambichler *et al.*, 2007)。雖然添加 TGF- $\beta$ 1 可以增加 TbRII 的量及減少 MMP1 的表現，但是由 UV 輻射作用下增加 TGF- $\beta$ 1 的釋出卻因引起細胞訊息傳遞失調而不具相同作用 (Yin *et al.*, 2002)。UVA 事實上曾被證實會增加 TGF- $\beta$ ，卻也同時會造成細胞內訊號的缺陷，即 TGF- $\beta$  與其接受器 TGF- $\beta$  type II receptor (TbRII) 的結合會降低 (Mori *et al.*, 1998)。其他研究團隊也得到類似的結果，並且發現到外加的 TGF- $\beta$  對於 MMP1 表現的抑制作用是透過 Smad3 及 Smad4 所引導的 AP1 路線 (Yuan & Varga, 2004)。此外，TGF- $\beta$ 1 也被發現與 elastin 的表現有關 (Gibson *et al.*, 1995)。TGF- $\beta$ 1 type II receptor 被認為是與 Cysteine-rich 61 (CYR61) 有關，CYR61 是一個與調節膠原蛋白穩定有關的蛋白質分子 (Lau & Lam, 1999)。不論是正常老化或是光照射引起的皮膚老化都會有較強的 CYR61 基因表現伴隨著 TGF- $\beta$ 1 type II receptor 的下降調節現象 (down regulation)，因為 TGF- $\beta$ 1 type II receptor 與 TGF- $\beta$ 1 的訊息傳遞有絕對關係，因此也會與 extracellular matrix 的膠原蛋白有關 (Quan *et al.*, 2006)。另外皮膚老化與 CYR61 的關係也被認為是與 MAP kinase 路徑活化 AP1 有關 (Han *et al.*, 2003; Kunz *et al.*, 2003; Quan *et al.*, 2006)，而光照射誘發的老化現象會造成 MAP kinase 路徑活化 AP1 的活化現象 (Fisher *et al.*, 1996; 1998)。

Macrophage migration inhibitory factor (MIF)原本由淋巴細胞所釋放出的一種 lymphokine 對於巨噬細胞具有強力的活化作用，也被認為與細胞所引發的免疫作用有相關性 (Bloom and Bennett, 1966 ; David, 1966)。皮膚細胞後來也被發現會釋放這種激素 (Shimizu *et al.*, 1966)，且在 UVA 的照射之下會被刺激並由纖維母細胞釋放出來，MIF 可以磷酸化 MAP kinase 進而增加 AP1 與 DNA 的結合現象並增加 MMP1 的增生，此增生現象可以被 MIF 抗體及使用 PKC 抑制劑所阻斷 (Watanabe *et al.*, 2004)。

UVB 輻射線引起皮膚發炎及可能的癌化現象與下列兩種酵素的調節有關：ornithine decarboxylase (ODC) 及 cyclooxygenase (COX) (Auvinen *et al.*, 1992; Herschman *et al.*; 1995)。不論是體內或體外試驗都證實 UVB 照射會增加 ODC 的產生 (Rosen, *et al.*, 1990)；在小老鼠以 TNF $\alpha$ 刺激之下，ODC 的活性是經由 COX 而產生 (Verma *et al.*, 1977 ; Yamamoto *et al.*, 1992)，然而在人體則不伴相同之作用 (Arnold *et al.*, 1992)。Soriani 等人 (1999) 以不同劑量的 UVB 照射人類角質細胞及皮膚纖維母細胞之後，也只發現 COX-2 的基因表現增加，ODC 的基因表現則維持不變。COX 分解花生四烯酸 (arachidonic acid) 為前列腺素 (prostaglandins, PGs)，其中 PGE2 曾被證實在纖維母細胞上可以誘導多種 MMP 的表現 (Pentland *et al.*, 1995; Wahl and Lampel, 1987; Mauviel *et al.*, 1994)。除此之外，PGE2 也是一種已知的膠原蛋白合成的抑制物質 (Varga *et al.*, 1987 ; Clark *et al.*, 1982)。因此，PGE2 被認為是在皮膚老化過程中誘導 MMPs 活性及促進基質蛋白質分解上扮演某種重要角色。另外，使用選擇性 COX2 抑制劑(如 NS-398) 則可以有效抑制 COX2、PGE2 及 MMP1 的蛋白質表現 (Han *et al.*, 2004)。COX mRNA 的表現是經由 transcription factor NF $\kappa$ B 所控制，其活性又受到 I $\kappa$ B 的磷酸化作用調控。這條路徑的示意圖如下：



UV 輻射線作用在哺乳動物細胞株時具有活化 NFκB 及其所調節之基因 (Bender *et al.*, 1997; Herrlich *et al.*, 1997)。此外，MAPKs 及 NFκB 路徑參與了 IL-1β 對 MMP1 表現的調節 (Fan *et al.*, 2006)。皮膚纖維母細胞在 UVA 或是 UVB 輻射線作用下會經由 NFκB 調節 IL-6 基因進而大量釋放 IL-6，經證實 IL-6 會引發 MMP1 的表現 (Kock *et al.*, 1990 ; Wlaschek *et al.*, 1994 ; Kondo *et al.*, 1997; Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997 ; Brenneisen *et al.*, 1999 ; Wenk *et al.*, 2004)。除此之外，IL-6 及其他的細胞素 (如 IL-8、TNFα) 或是生長因子 (CSF、PDGF) 都是受到 IL-1α 的調節進而影響到纖維母細胞生產細胞外基質 (extracellular matrix) 的作用，並間接影響到皮膚的正常功能 (Elisa & Lentz, 1990 ; Shroder *et al.*, 1990 ; Last-Barney *et al.*, 1988 ; Zucali *et al.*, 1986 ; Raines *et al.*, 1989)。有趣的是：UV 輻射線引起的肌膚傷害是透過 IL-1α 的 autocrine/paracrine 方式去活化 NFκB (Bender *et al.*, 1998)。Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 雖然是白血球活化時所釋放的一種與發炎有關的細胞激素，MCP-1 亦被證實在適當的刺激之下會由皮膚纖維母細胞所釋放 (Yoshimara *et al.*, 1989)。在大鼠的肺部組織發現 MCP-1 會刺激膠原蛋白的基因表現，這個現象則是間接經由向上調整

(up-regulation) TGF- $\beta$  基因表現所致 (Gharaee-Kermaniet al., 1996)。之後, MCP-1 在皮膚纖維母細胞中再次被證實會誘發 IL-1 $\alpha$  合併增加 MMP1 基因表現, 此現象被認為是一種 autocrine loop (Yamamoto *et al.*, 2000)。

此研究計畫將針對本研究室先前所發現: 水溶性綠藻萃出物具有抑制 TPA (為 PKC 的活化物質) 及 UVB 誘發 MMP1 的表現的功效 (Shih & Cherng, 2008; NSC 91-2626-B-041-001), 作進一步研究水溶性綠藻萃出物抑制 MMP 的細胞分子路徑, 並將此有效的水溶性綠藻萃出成分應用於化妝品上, 當作可以減輕因紫外線引起的光傷害的產品。計畫將探討水溶性綠藻萃出物是否對於 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 及 migration inhibitory factor (MIF) 有所影響, 其中又以前者需要謹慎評估, 因為由 UVA 所誘導的和額外添加的 TGF- $\beta$  對於 MMP1 的影響不相同, 因此 TGF- $\beta$  type II receptor (TbRII) 的 mRNA 表現也須一併加以探討。已知 UVA 會經由 PCK、MAP kinase、AP1 transcription factors (c-Fos & c-Jun) 進而影響 MMP1 及膠原蛋白的表現, 因此水溶性綠藻萃出物是否可有效干擾此路徑達到抑制 MMP1 之功效也將一併在此研究中探討。由於 PGE2 已知會經由 NF $\kappa$ B 路徑透過 COX-2 影響 MMP1 的活性及細胞外基質蛋白質 (extracellular matrix) 的製造, 細胞激素 (如 IL-1、IL-6、TNF $\alpha$  等) 會作用在細胞膜上接受器影響 NF $\kappa$ B 活性, 因此水溶性綠藻萃出物是否對於 NF $\kappa$ B 路徑具有相同的影響作用將是另一個階段的探討目標。

## 研究方法

1. TGF- $\beta$  的量可以使用 ELISA kits 去測得。

2.1 TbRII mRNA 217bp (RT-PCR) see ref: TRbII primer for PCR condition

2.1.1 Sense primer: 5'TCA TGG CAA ACT GTC TCT AGT GTT A3'

2.1.2 Antisense primer: 5'CGG TTA ATA ACG ACA TGA TAG TCA C3'

## 2.2 B-actin mRNA 295 bp

2.2.1 Sense Primer : 5' TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT A3'

2.2.2 Antisense primer: 5'CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA A3'

2.2.3

## 3. CYR61 mRNA

3.1 Sense Primer: 5' TCAAAG ACC TGT GGA ACT GGT ATC-3'

3.2 Antisense primer: 5'-CAC AAA TCC GGG TTT CTT TCA-3'

## 4.1 c-Fos 的 mRNA (332bp) 的表現—RT-PCR

Sense primer: 5'-GGA GAA TCC GAA GGA AAG G-3'

Antisense primer: 5'-5'GCT TGG GCT CAG GGT CAT TG-3'

## 4.2 c-Jun 的 mRNA (196bp) 的表現—RT-PCR

Sense primer: 5'-GGA TCA AGG CGG AGA GGA AG-3'

Antisense primer: 5'-GCG TTA GCA TGA GTT GGA AC-3'

PCR conditions are 30 cycles of 94°C for 50 seconds , 55°C for 50 seconds and 72°C for 90 seconds followed by a 7-minute extension at 72°C.

## 5. MCP-1 濃度表現—可以使用 ELISA kits 去測得。

### 結果與討論：

TGF-β是一種無處不存在的多功能性細胞激素 (cytokine)，兼具調節細胞增生和分化、組織重塑 (tissue remodeling) 及組織修護等功能 (Massague,1998)。三種不同的UV波長對於TGF-β的影響似乎無法自單一層次的纖維母細胞探討出來，但是TGF-β是作用在TbRII receptors，所以當細胞暴露到這些不同的UV波後，其RNA的表現，只有UVB具有抑制作用，而水綠的作用之下則可以改善因UVB作用而減少的TbRII RNA表現。因為TGF-β與TGF-β type II receptor



(TbRII)結合後經由一連串的作用即可以調節 Type I 膠原蛋白基因表現(Ghosh *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Akagi *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1990; Slack *et al.*, 1993) 及 elastin 的表現有關 (Gibson *et al.*, 1995)。

Cysteine-rich 61 (CYR61) 是一個與調節膠原蛋白穩定有關的蛋白質分子 (Lau & Lam., 1999)。不論是正常老化或是光照射引起的皮膚老化都會有較強的 CYR61 基因表現伴隨著 TGF- $\beta$ 1 type II receptor 的下降調節現象 (down regulation)，實驗結果亦證實三種 UV 波都具有向上調節 CYR61 基因的作用，但是 UVA 的調節作用比其他 2 種 UV 波較弱。水綠的作用之下可以將過度表現的 CYR61 基因抑制。配合上述作用，水綠在抗 UV 引的老化現象可能是因為此其中一個機轉達到功效。

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 雖然是白血球活化時所釋放的一種與發炎有關的細胞激素，MCP-1 亦被證實在適當的刺激之下會由皮膚纖維母細胞所釋放 (Yoshimura *et al.*, 1989)。MCP-1 的產量在 UVA 活 UVB 照這之後的最大產生時間不一樣，然而 IL-6 在 UV 照這的作用下只有 UVB 具有刺激作用，UVA 在實驗測量期間都不具變化。水溶性綠藻 (水綠) 對於不論是 UVA 或是 UVB 誘導的 MCP-1 都具有抑制作用，但是對於 IL-6 的影響卻是加強，後者的刺激作用似乎是與水綠與調節免疫功效有關，因此結果是符合預期。MCP-1 在皮膚纖維母細胞中曾被證實會誘發 IL-1 $\alpha$  合併增加 MMP1 基因表現，此現象被認為是一種 autocrine loop (Yamamoto *et al.*, 2000)。因為水綠不具抑制 IL-6 的作用，所以先前本實驗是證實水綠具有抑制 MMP-1 的作用可能只是抑制在對於 MCP-1 影響 MMP-1 的表現上。

**圖表：**

**圖 1. TGF- $\beta$**

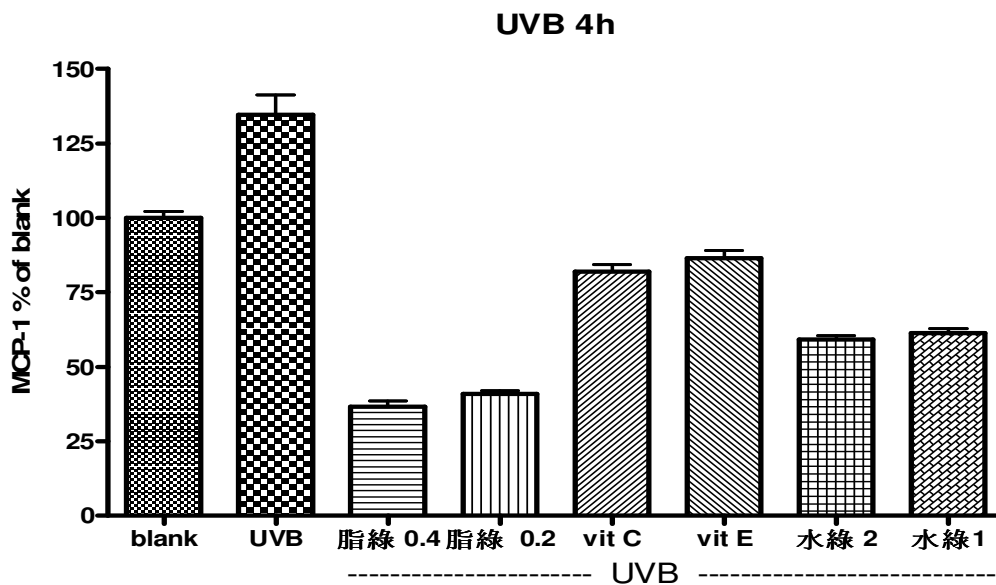
不論是以 UVA，UVB，或 UVC 照射都不具有誘發皮膚纖維母細胞釋放 TGF- $\beta$  的作用 (如下表所示)。

圖 2. TNF- $\alpha$

不論是以 UVA，UVB，或 UVC 照射都不具有誘發皮膚纖維母細胞釋放 TNF- $\alpha$  的作用（如下表所示 n=3）。

圖 3. MCP-1

以不同的 UV 照射的結果發現 UVB 在照射 4 小時後的 MCP-1 釋放量與未照射的組別有最大差距，因此選擇此照射後時間當作標準收集樣品時間。當皮膚纖維母細胞加有脂溶性綠藻（脂綠）0.4 或 0.2mg/ml 的劑量時，UVB 照射後 4 小時後的 MCP-1 的釋放量就明顯大幅減少，雖然細胞若是加有維生素 E 或 C 也可以明顯抑制 MCP-1 的釋放但是其抑制結果顯然不如脂綠的效果。此外水溶性綠藻（cgf）在之前的計畫中針對 MMP 活性與 RNA 的表現都有抑制作用，因此 cgf 也在此被測試其功效，結果發現 cgf（1 mg/ml 或是 2 mg/ml）對 MCP-1 的抑制功效仍是比維生素 E 或 C 較佳（結果見下圖 n=6）。



以不同的 UV 照射的結果發現 UVA 在照射 8 小時後的 MCP-1 釋放量與未照射的組別有最大差距，因此選擇此照射後時間當作標準收集樣品時間。由此並且發現不同波長對 MCP-1 的釋放刺激作用是不同的。

當皮膚纖維母細胞加有脂溶性綠藻（脂綠）0.4 或 0.2mg/ml 的劑量時，UVA 照射 8 小時後的 MCP-1 的釋放量就明顯大幅減少，雖然細胞若是加有維生素 E 或 C 也可以明顯抑制 MCP-1 的釋放但是其抑制結果顯然不如脂綠的效果。此外水溶性綠藻（cgf）在之前的計畫中針對 MMP 活性與 RNA 的表現都有抑制作用，因此 cgf 也在此被測試其功效，結果發現 cgf 1 mg/ml 對 MCP-1 的抑制功效與維生素 E 或 C 的作用在抑制 UVA 對 MPC-1 的刺激作用則效果較相當，而 cgf 2 mg/ml 對 MCP-1 的抑制功效則較維生素 E 或 C 的作用要強些（結果見下圖 n=6）。

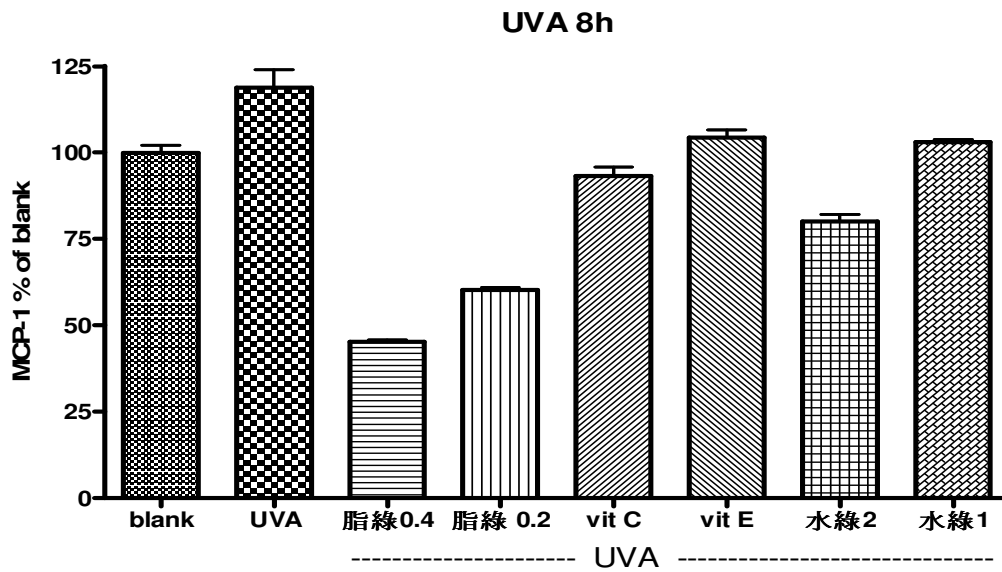
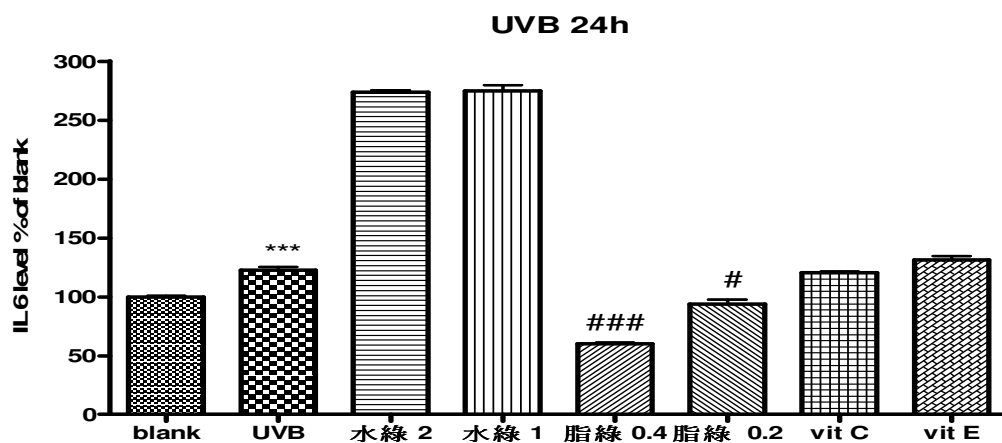


圖 4. IL-6

紫外線波長 UVA 及 UVB 對皮膚纖維母細胞釋放 IL-6 的時間關係如下圖所示。UVA 對 IL-6 的作用幾乎與沒有照射的細胞所釋放的 IL-6 的量一樣，因此 UVA 並無繼續再進行對 IL-6 的試驗。然而 UVB 則在照射後的 12 小時有明顯增加 IL-6 的釋放量且維持到 24 小時。此後 IL-6 實驗均選擇照射後 24 小時後收集。當皮膚纖維母細胞加有脂溶性綠藻（脂綠）0.4 或 0.2mg/ml 的劑量時，UVB 照射後 24 小時的 IL-6 的釋放量就明顯減少，然而細胞若是加有維生素 E 或 C 則抑制 IL-6 的釋放便不明顯。此外水溶性綠藻（水綠）對 IL-6 則有刺激作用（結果見下圖）。



mRNA data

皮膚纖維母細胞以 UVA 或 UVB 照射後 24 小時收集細胞抽去全部 RNA 再以 PCR 轉成 DNA 並進行下列實驗。

### figure of gel density

圖 5. TbRII RNA

紫外線 UVB 對 TbR II mRNA 有稍微明顯的抑制作用，較高劑量的水綠 (cgf) 才有減少抑制作用，脂綠 (lipo) 和維生素 C 都不具拮抗 UVB 抑制 TbR II mRNA 的功效。

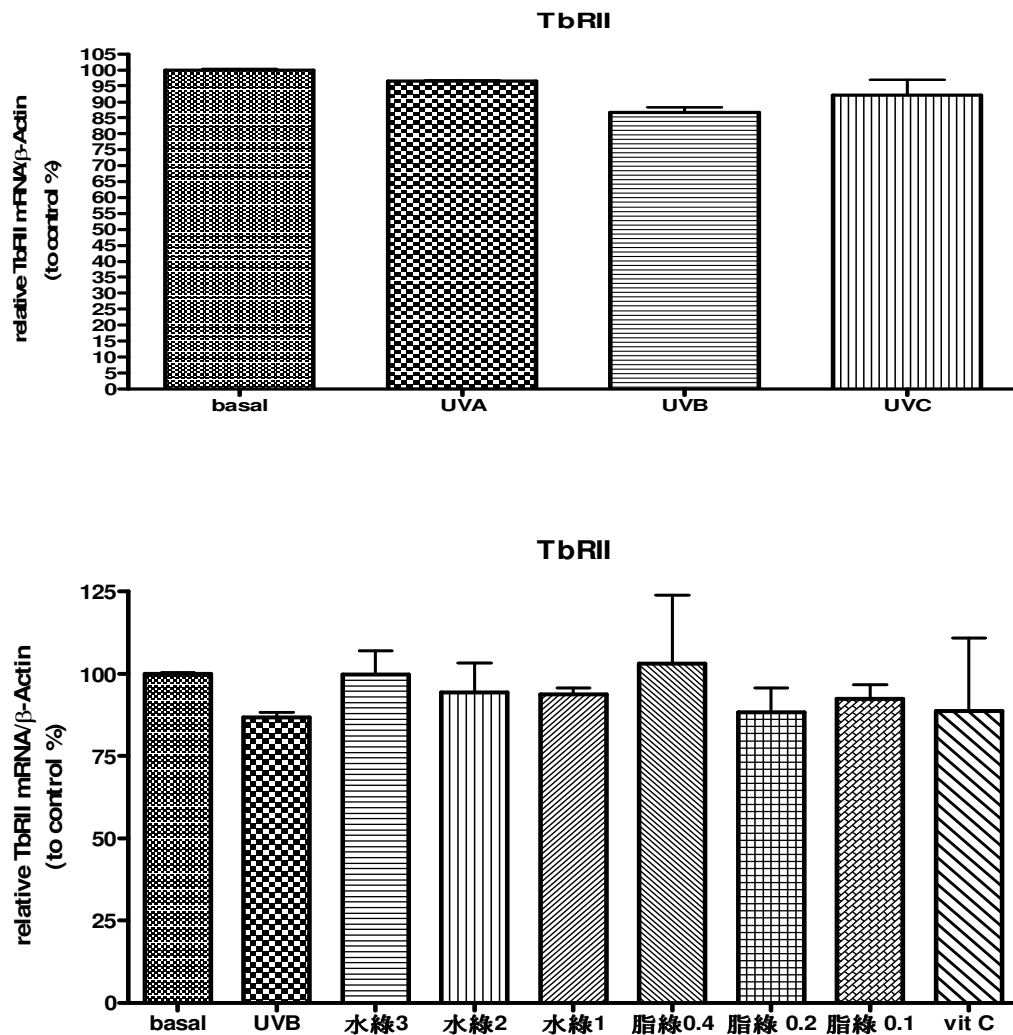
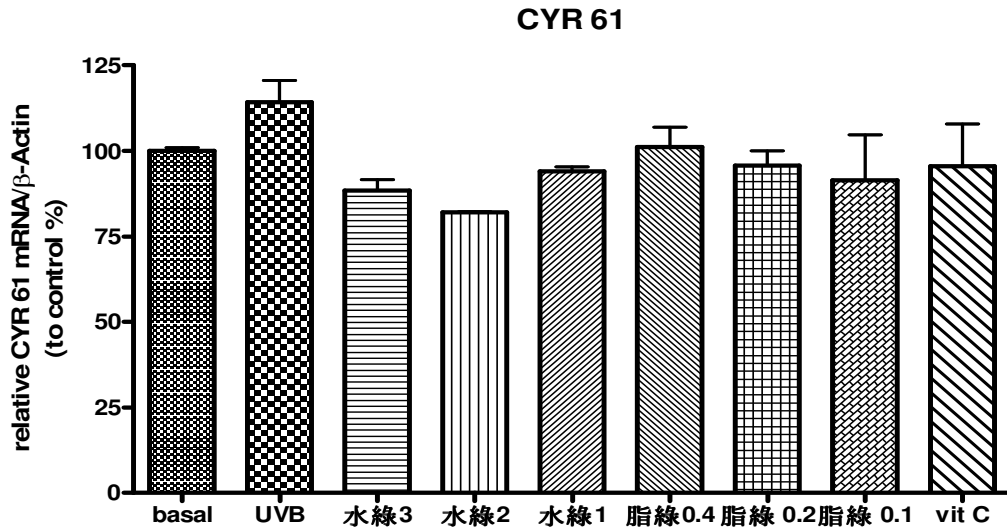


圖 6. CYR61 mRNA

不論是 UVA、UVB 或是 UVC 對 CYR61 mRNA 都有刺激作用，但是 UVB 及 UVC 的刺激作用較強。水綠 (cgf)、脂綠 (lipo)、及維生素 C 都有減少 CYR61 mRNA 的功效，但以水綠的作用最為明顯。



轉錄因子的表現：

圖 7. c-FOS mRNA

轉錄因子 AP-1 是 c-Fos 和 c-Jun 的組合，UVC 對 c-Fos 的作用與對 c-Jun 的作用是相反的。而水綠 (cgf)、脂綠 (lipo)、及維生素 C 似乎也是集中作用在 c-Fos 而非 c-Jun。若與 CYR61 mRNA 比較起，似乎 CYR61 mRNA 的表現是受的 c-Fos mRNA 的影響而非 c-Jun。

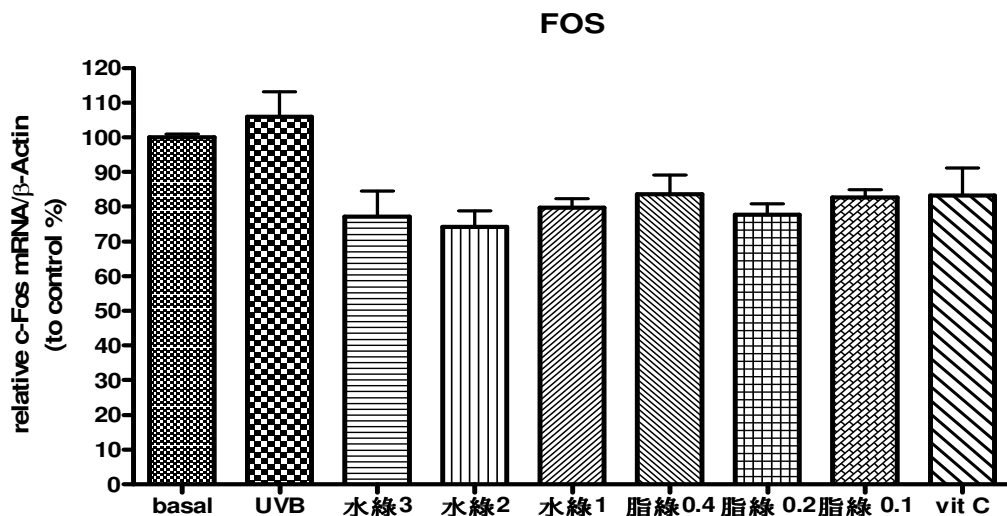
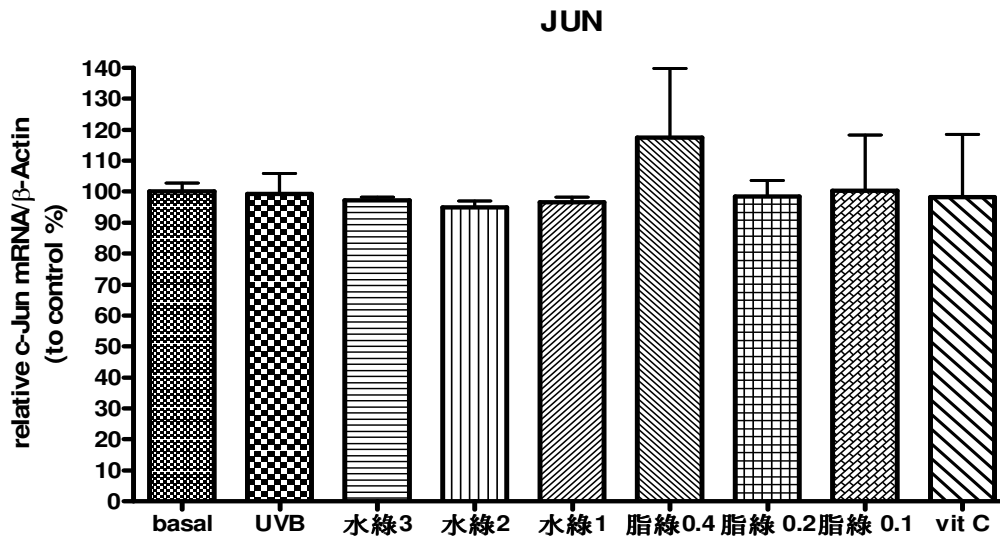


圖 8. c-Jun



參考文獻

- Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, Kaneda Y, Ando A, Orita Y, Kamada T, Ueda N, Imai E: Inhibition of TGF- $\beta$ 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996, 50:148–155
- Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, Krutmann J (1999) Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J. Biol. Chem.* 274:15345-15349
- Bloom, B. R., and Bennett, B. (1966) *Science* 153, 80–82
- Chen S-J, Yuan W, Lo S, Trojanowska M, Varga J: Interaction of Smad3 with a proximal Smad-binding element of the human 12(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation of TGF- $\beta$ . *J Cell Physiology* 2000, 183:381–392
- David, J. R. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 56, 72–77
- Elisa JA and Lentz V (1990) IL-1 and TNF synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J. Immunol.* 145: 161-166
- Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ: Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996, 379:335–339
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ: Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337:1419-1428,

1997

- Fisher GJ, Voorhees JJ: 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, 1998
- Fisher G, Datta S, Wang Z, Li X, Quan T, Chung J, Kang S, Voorhees J: c-Jun dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoid acid. *J Clin Invest* 2000, 106:661–668
- Ghosh A, Yuan W, Mori Y, Varga J: Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF- $\beta$  involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene* 2000, 19:3546–3555
- Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS, Breuksch S, Altmeyer P, Kreuter A. 2007 Significant downregulation of transforming growth factor-beta signal transducers in human skin following ultraviolet-A1 irradiation. *Br. J. Dermatology* 156: 951-956
- Gharaee-Kermani, M., E. M. Denholm, and S. H. Phan. 1996. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor  $\beta$ 1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J. Biol. Chem.* 271:17779.
- Giambernardi TA, Grant GM, Taylor GP, Hay RJ, Maher VM, McCormick JJ, Klebe RJ (1998) Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol.* 16:483-496
- Han J-S, Macarak E, Rosenbloom J, Chung K, Chaqour B: 2003 Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways. *Eur J Biochem*, 270:3408–3421
- Kreuter A, Hyun J, Skrygan M, Sommer A, Tomi NS, Breuckmann F, Altmeyer P, Gambichler T. 2006 Ultraviolet A1 phototherapy decreases inhibitory SMAD7 gene expression in localized scleroderma. *Arch Dermatol Res.* 298(6):265-72.
- Krutmann J 2001: The role of UVA rays in skin aging. *Eur J Dermatol* 11:170-171,
- Kunz M, Moeller S, Koczan D, Lorenz P, Wenger R, Glocker M, Thiesen H-J, Gross G, Ibrahim S., 2003: Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *J Biol Chem*, 278:45651–45660
- Kuroda K & Shinkai H (1997) Gene expression of type I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol. Res.* 289:567-572

- Lau L & Lam SC-T: 1999 The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res*, 248:44–57
- Mori Y, Hatamocji A, Arkawa M, Ueki Y. (1998) Reduced expression of mRNA for transforming growth factor b and TGF $\beta$  receptor I and II and decreased TGF $\beta$  binding to the receptors in vivo-aged fibroblasts. *Arch Dermatol. Res.* 290: 158-162
- Quan T, HeT, Voorhees JJ, Fisher GJ: Ultraviolet irradiation blocks cellular responses to transforming growth factor-b by down-regulating its type-II receptor and inducing Smad7. *J Biol Chem* 276:26349-26356, 2001
- Quan T, TianYuan He, Yuan Shao, Lin Lin, Sewon Kang, John J. Voorhees, and Gary J. Fisher (2006) Elevated Cysteine-Rich 61 Mediates Aberrant Collagen Homeostasis in Chronologically Aged and Photoaged Human Skin. *Am. J. Pathology*, 169(2) :482-490.
- Raines, E.W., Dower, S.K., and Ross, R. 1989. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science*. 243:393–396.
- Roberts A, Heine U, Flanders K, Sporn M: Transforming growth factor- $\beta$ . Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann NY Acad Sci* 1990, 580:225–232
- Shih M-F & J-Y Cherng (2007) Potential Protective Component of fresh grown Unicellular Green Algae (Resilient Factor) in PMA- and UVB-induced MMP1 expression and degradation of extracellular protein in human skin fibroblasts. *Eur. J. Dermatol.* 18(3):303-307
- Shimizu, T., Ohkawara, A., Nishihira, J., and Sakamoto, W. (1996) *FEBS Lett.* 381, 199–202
- Shroder, J.-M., Sticherling, M., Henneicke, H.H., Preissner, W.C., and Christophers, E. 1990. IL-1a or tumor necrosis factor-a stimulate release of three NAP/IL-8-related neutrophil chemotactic proteins in human dermal fibroblasts. *J. Immunol.* 144:2223–2232.
- Slack J, Liska D, Bornstein P: Regulation of expression of the type I collagen genes. *Am J Med Genet* 1993, 45:1940–1951
- Talwar HS, Griffiths CEM, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ: Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J Invest Dermatol* 1995, 105:285–290
- Verzijl N, DeGroot J, Thorpe S, Bank R, Shaw M, Lyons T, Bijlsma W, Lafeber F, Baynes J, TeKoppele J: Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2000, 275:39027–39031
- Watanabe, H., Shimizu, T., Nishihira, J., Abe, R., Nakayama, T., Taniguchi, M., Sabe, H., Teruo Ishibashi, T., and Shimizu, H., 2004. Ultraviolet A-induced Production of Matrix Metalloproteinase-1 Is Mediated by Macrophage Migration Inhibitory



- Factor (MIF) in Human Dermal Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279: 1676-1683
- Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, et al: TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71:1003-1014, 1992
- Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, & Krieg T (2000) Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblast by an autocrine IL-1a loop. *J. Immunol.* 164: 6174-6179
- Yin L, Morita A, Tsuji T., The Crucial Role of TGF- $\beta$  in the Age-Related Alterations Induced by Ultraviolet A Irradiation. *J. Invest. Dermatol.* 120: 703-705, 2002
- Yoshimura, T., E. A. Robinson, S. Tanaka, S. Appella, and E. J. Leonard. 1989. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J. Immunol.* 142:1956.