

각질형성세포 유래 엑소좀이 피부각질형성세포의 증식과 이주에 미치는 영향

김도윤·유호진·황대일·장상희*·이환명[†]

호서대학교 화장품과학과,
*구미대학교 식품영양전공

(2016년 10월 11일 접수, 2016년 11월 21일 수정, 2016년 11월 29일 채택)

Effect of Keratinocyte Derived Exosome on Proliferation and Migration on Human Skin Keratinocyte

Do Yoon Kim, Ho Jin Yu, Dae Il Hwang, Sang Hee Jang*, and Hwan Myung Lee[†]

Department of Cosmetic Science, College of Life and Health Science, Hoseo University,
20 Hoseo-ro, Baebang-eup, Asan, Chungcheongnam-do 31499, Korea

*Department of Food and Nutrition, Gumi University, Gumi, Gyeongsangbuk-do 39213, Korea

(Received October 11, 2016; Revised November 21, 2016; Accepted November 29, 2016)

요약: 엑소좀은 세포에서 분비되는 작은 소낭체로서, 기원세포와 조직에 따라 다양한 기능을 수행하며, 세포생존 및 세포 간 커뮤니케이션에 중요한 역할을 한다. 최근 엑소좀을 활용하여 종양연구, 면역질환 개선, 질병진단 bio-marker 개발 등 다양한 분야에서 연구가 진행되고 있으나, 피부세포에서 분비기전 및 피부 생리적 기능에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서 인체피부 유래 각질형성세포(HaCaT)로부터 분리된 엑소좀이 피부각질형성세포의 증식과 이주에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. HaCaT으로부터 ExoQuick-TC를 활용하여 엑소좀을 분리하고, 열처리 엑소좀(boiled exosome)과 무처리 엑소좀(unboiled exosome)으로 구분하였다. HaCaT 유래 엑소좀은 농도 의존적으로(0.1 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) HaCaT의 증식을 유도하였으며, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군(control)에 비해 각각 $186.96 \pm 3.87\%$ (열처리) 또는 $193.48 \pm 10.48\%$ (무처리)의 증식 유도활성을 나타내었다. 또한 HaCaT 유래 무처리 엑소좀은 농도 의존적인(0.1 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) HaCaT의 이주활성을 나타내었고, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군에 비해 $179.39 \pm 4.89\%$ 의 이주를 유도하였다. 그러나 열처리 엑소좀은 이주 유도활성을 나타내지 않았다. 뿐만 아니라 무처리 HaCaT 유래 엑소좀은 collagen sprout outgrowth를 농도 의존적으로 유도함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해서 HaCaT 유래 엑소좀은 지질 및 열에 안정한 물질이 세포의 증식을 유도하고, 단백질 또는 열에 불안정한 물질이 세포의 이동 및 sprout out growth 활성화에 관여하는 것으로 확인되었다. 따라서 피부각질형성세포 유래 엑소좀은 피부의 재생피화 및 상처치유 등의 활성을 나타낼 수 있으며, 향후 화장품소재로서 응용 가능성이 확인되었다.

Abstract: Exosome, a small vesicle secreted from cells, has diverse functions depending on cell origins and tissue types and plays a important role in cell viability and intercellular communication. Recently, many researchers have demonstrated the use of exosomes for the treatment of cancers and immune diseases, and the development of diagnostic biomarker. However, the secretion mechanism of exosome from skin cell and its physiological functions in skin remain unclear. Thus, this study aimed to explore whether keratinocyte-derived exosome affects proliferation and migration in HaCaTs. Exosomes were isolated from HaCaTs by ExoQuick-TC and then boiled or unboiled. Boiled and unboiled exosome induced proliferation in HaCaTs in a dose-dependant manner (0.1 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively. Boiled and

[†] 주 저자 (e-mail: kacsital@hoseo.edu)
call: 041)540-9551

unboiled exosome at concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ increased proliferation level in HaCaTs by $186.96 \pm 3.87\%$ and $193.48 \pm 10.48\%$ compared with control group. Unboiled exosome stimulated migration in HaCaTs in a dose-dependent manner (0.1 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), which reached a maximum at concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($179.39 \pm 4.89\%$ of control), but boiled exosome did not affect HaCaT migration. In addition, unboiled exosome (0.1 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dose-dependently stimulated sprout outgrowth in HaCaTs. These results demonstrate that in exosome from HaCaTs, heat-stable components such as lipid may induce HaCaT proliferation and heat-unstable components such as protein may stimulate migration and sprout outgrowth in HaCaTs, thereby leading to reepithelialization and skin-wound healing activities. It is concluded that exosomes from HaCaTs may be used as cosmetic materials.

Keywords: skin, keratinocyte, exosome, migration, proliferation

1. 서 론

엑소좀(exosome)은 세포에서 분비되는 막구조의 작은 소낭체(30 ~ 120 nm)로서, 다포성소체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 소기관에서 기원하여 세포 밖으로 방출 및 분비되어진다[1-3]. 세포 내 흡입(endocytosis)을 통해 생성된 후기 엔도솜(late endosome)이 reverse-budding에 의해 강내막소포(intraluminal vesicles, ILVs)를 내포한 다포성소체로 생성되며, lysosome과 결합 또는 분해되거나 re-package 과정을 통해 원형질막(plasma membrane)과 융합한다[3,4]. 이때 세포 밖으로 방출되는 강내막소포를 엑소좀이라고 하며, 기원세포에 유래된 다양한 종류의 인지질과 단백질(receptor protein, enzyme, HSP family, GPI 단백질 등), 유전물질(DNA, RNA 등) 등을 함유하고 있다[2,4]. 엑소좀은 림프구, 암세포, 혈소판, 대식세포, 신경세포, 상피세포 등 다양한 세포에서 분비되어 혈액, 모유, 양수, 뇌척수액, 소변, 복수액 등의 체액(body fluid)에 존재하며, 다른 세포 또는 자가 세포에게 단백질, 지질, 유전정보 등을 전달(molecular transfer)하여 세포의 증식(proliferation)과 분화(differentiation), 세포자멸사(apoptosis) 및 혈관신생(angiogenesis) 등을 조절하고, 세포 간 커뮤니케이션(intercellular communication)을 유도하는 역할을 한다[3,4,7]. 특히, 암세포 유래 엑소좀 표면에는 T림프구의 세포자멸사를 유도하는 단백질이 발현되어 면역반응을 억제한다고 보고되었으나, 수지상세포(dendritic cell)유래 엑소좀의 표면에는 T 림프구 혹은 MHC II의 활성을 촉진하는 단백질이 발현되어 면역활성을 촉진한다고 보고됨에 따라 엑소좀은 기원세포에 따라 구성성분의 특성과 역할이 달라질 수 있다[5-7]. 뿐만 아니라 인체 내·외 다양한 스트레스와 자극은 엑소좀의 구성요소를 변형시켜 그

기능이 상이할 수 있으며, 세포 간 커뮤니케이션을 통해 인체의 항상성 유지와 질병 발생에 영향을 미칠 수 있다[6,7].

최근 엑소좀의 중요성이 보고됨에 따라 다양한 분야에서 엑소좀의 proteom 및 mRNA 분석하고 조직기원의 특이적인 구성성분 DB 구축과 질병진단 bio-marker 개발에 대한 연구가 급증하고 있다[5-8]. 피부과학 연구 분야에서는 human umbilical cord mesenchymal stem cell 유래 엑소좀이 화상피부의 피부재생을 유도하여 상처치유 활성을 나타낸다고 보고되었으며[9], 각질형성세포(keratinocyte) 유래 엑소좀이 melanosomal proteins의 발현을 증가시켜 멜라닌 합성을 유도한다고 보고되어[10] 엑소좀을 활용한 연구가 진행되고 있으나, 그 중요성에 비해 연구의 진행 정도가 낮은 상태이다. 따라서 본 연구에서 인체피부 유래 각질형성세포를 이용하여 엑소좀 분리 방법을 구축하고 피부각질형성세포의 증식과 이주에 미치는 영향을 확인함으로써 피부세포 유래 엑소좀의 역할을 규명하고, 나아가 새로운 피부생리활성 소재 개발의 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

본 실험에 사용된 recombinant human epidermal growth factor (rhEGF)는 R&D systems (USA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, phosphate buffered saline (PBS)은 Hyclone (USA) 또는 Invitrogen (USA) 구입하였다. Type I collagen은 BD bioscience (USA)에서 구입하였으며, bovine serum albumin은 Sigma (USA)에서 구입하였다. Ez-Cytox kit은 Daeil lab service (Korea)에서 구입하였으며, Diff-Quick

은 Baxter Healthcare Corporation (USA)에서 구입하였다.

2.2. 세포 배양

본 실험에 사용된 인체 피부 유래 각질형성세포 (human skin keratinocyte cell line; HaCaT)는 대구 경북 한방산업진흥원에서 분양받아 사용하였다. HaCaT은 DMEM 배지에 10% FBS와 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

2.3. 피부각질형성세포 유래 엑소좀 분리(Exosome Isolation)

HaCaT으로부터 엑소좀을 분리하기 위해 ExoQuick-TC (system Bioscience, USA)를 사용하였다. HaCaT을 무혈청 DMEM에 24 h 동안 배양시킨 후, HaCaT 배양 배지를 초미세여과(ultrafiltration, 100 kDa/off)를 이용하여 10 mL로 농축 시켰다. ExoQuick-TC를 처리하여 4 °C에서 12 h 반응시킨 후 원심분리(1,500 × g, 30 min)를 이용하여 상층액을 제거하고 엑소좀을 분리하였다. 확보된 엑소좀은 PBS에 녹인 후 99 °C에서 10 min간 열처리한 엑소좀(boiled exosome)과 무처리 엑소좀(unboiled exosome)으로 구분하여 실험에 사용하였다.

2.4. Atomic Force Microscopy을 통한 엑소좀의 확인

HaCaT에서 분리된 엑소좀의 사이즈 및 형태적 특성은 원자현미경(atomic force microscopy)를 이용하여 확인하였다. 엑소좀을 saline-coated 슬라이드 글라스에 흡착시켜 광학현미경(light microscopy)으로 관찰한 다음 엑소좀이 포함된 조각 글라스를 접착테이프 open-type-glass-cell 이중 슬라이드로 장착하였다. 엑소좀의 건조를 막기 위해 hexylene glycol buffer를 처리하고 원자현미경을 이용하여 엑소좀의 사이즈 및 형태적 특징을 관찰하였다.

2.5. 세포 증식능 평가

HaCaT 유래 엑소좀의 세포 증식 유도능은 XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) assay를 통해 확인하였다. HaCaT을 96-well-plate (2 × 10³ cells/0.1 mL/well)에 분주하여 12 h 동안 배양 후, 엑소좀을 농도별로 처리하였다. 48 h 배양 후, well 당 10 µL의 Ez-Cytox kit reagent를 처리하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 30 min 동안 반응시킨

후, enzyme-linked immunosorbent assay reader (Synergy 2, Bio-Tek Instruments, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 세포 이주능 평가

HaCaT 유래 엑소좀의 세포 이주 유도능은 48-well microchemotaxis Boyden chambers (Neuro Probe, USA)를 이용하여 평가하였다. Bottom chamber에 엑소좀을 농도별로 주입하고, 0.1 mg/mL type I collagen으로 코팅된 polycarbonate membrane (8 µm pores, Neuro Probe)을 올려주었다. Upper chamber에 HaCaTs (3 × 10⁴ cells/well)을 주입하고 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 3 h 동안 배양 후, membrane을 Diff-Quick으로 고정 및 염색하여 이주된 세포를 측정하였다.

2.7. Collagen Sprout Assay

HaCaTs (2 × 10⁷ cells/mL)과 type I collagen, 1N NaOH 및 10X DMEM을 혼합하여(final 1X DMEM, pH 7.2) 24-well plate에 spotting 한 후 엑소좀을 농도별로 처리하였다. 72 h 동안 배양시킨 후 Diff-Quick을 이용하여 collagen spot을 고정 및 염색하였으며, NIH image software로 collagen spot의 out growth를 측정하였다.

2.8. Statistical Analysis

실험결과는 mean ± S.E.M으로 표기하였으며, Graphpad prism software (version 5.00, USA) 프로그램을 이용한 Student's *t*-test 방법을 통해 유의성 여부를 분석하였고, 그 결과 *p* < 0.05일 경우에 한하여 유의성을 인정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 피부각질형성세포 유래 엑소좀 확인

HaCaT으로부터 분리된 엑소좀의 표면조도는 Figure 1에 나타난 바와 같이 2차원과 3차원 이미지로 나타내었으며, 가로(1.5 µm) × 세로(1.5 µm) × 높이(20 nm)를 측정하였다. 2차원 이미지를 활용하여 엑소좀의 직경 사이즈를 확인한 결과 Figure 1C에 나타난 것과 같이 30 ~ 100 nm로 분석되었다. 따라서 ExoQuick-TC를 활용하여 HaCaT에서 분리한 세포 밖 소포체(extracellular

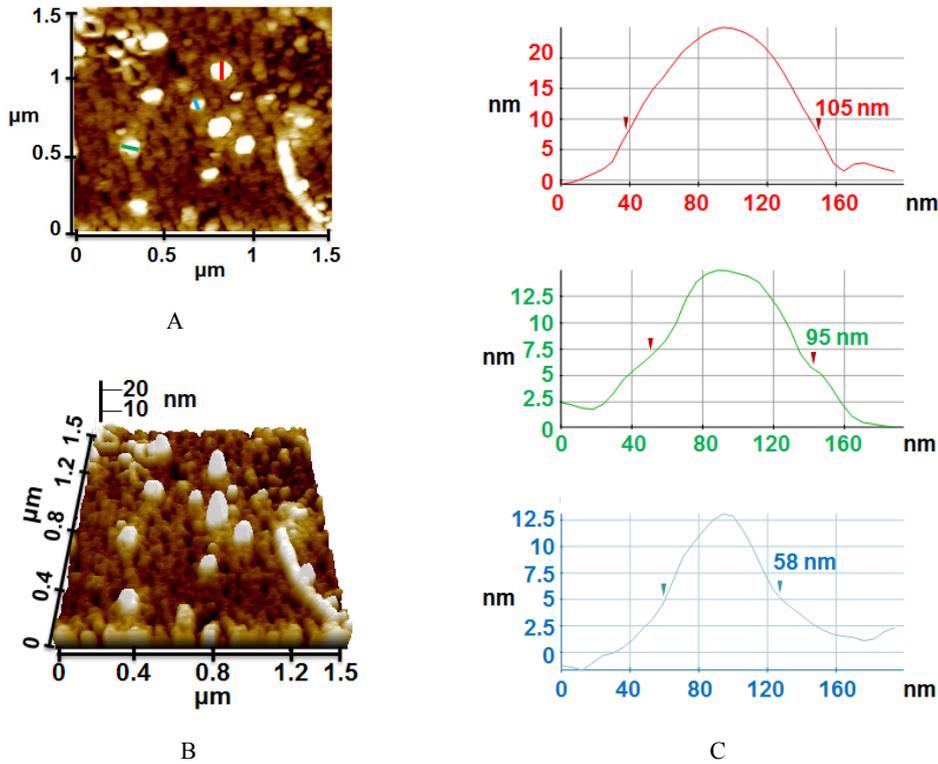


Figure 1. Atomic force microscopy image of keratinocyte exosome. (A, B) 2-(A) and 3-dimensional image (B) of exosome from keratinocyte. (C) Representative graphical images of exosome from keratinocyte with a diameter of 30 ~ 100 nm.

membrane vesicle)가 엑소좀 특이적인 사이즈를 나타내는 것으로 확인되었다.

3.2. 엑소좀의 피부각질형성세포 증식 유도 활성

피부각질형성세포의 증식은 피부조직의 재형성(re-epithelialization)과 상처치유 및 피부재생 등의 과정에서 필수 요소이며[11-17], HaCaT 유래 무처리(unboiled exosome)와 열처리 엑소좀(boiled exosome)은 각각 농도 의존적으로(0.1 ~ 20 μg/mL) HaCaT의 증식을 유도하는 것으로 확인되었다. Figure 2A에서와 같이 무처리 엑소좀이 5 μg/mL 농도(131.48 ± 2.71%)에서부터 통계적으로 유의한 세포 증식을 유도하였으며, 20 μg/mL에서 대조군(control)에 비해 193.48 ± 10.48%의 증식유도 활성을 나타내었다. 또한 Figure 2B에서와 같이 열처리 엑소좀이 1 μg/mL (128.14 ± 8.50%)에서 유의하게 세포 증식을 유도하였고, 20 μg/mL에서 대조군에 비해 186.96 ± 3.87%의 증식유도 활성을 나타내었다. 특히, 양성대조군으로 사용된 rhEGF (50 ng/mL, 132.59 ± 2.33%)에 비해 우수하거나, 유사한 증식 유도

활성을 나타내었다. 이러한 결과는 피부각질형성세포 유래 엑소좀의 지질 또는 열에 안정한 구성성분이 세포 증식에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

3.3. 엑소좀의 피부각질형성세포 이주 유도 활성

피부각질형성세포의 이주 활성은 증식과 함께 피부 재생과 상처치유 활성을 유도할 뿐만 아니라 laminin, type I 및 type IV collagen 등의 피부 구성단백질 합성을 촉진하여 견고한 피부 구조를 형성하고 피부 장벽 강화를 유도하는데 주요 과정으로 알려져 있으며 [12-17], HaCaT 유래 무처리 엑소좀(unboiled exosome)이 농도 의존적으로(0.1 ~ 20 μg/mL) HaCaT의 이주 유도 반응을 나타내었다. Figure 3A에서 나타난 것과 같이 무처리 엑소좀은 1 μg/mL (124.17 ± 6.28%)에서 유의한 세포 이주를 유도하였고, 20 μg/mL에서 대조군에 비해 179.39 ± 4.89%의 이주유도 활성을 나타내었다. 반면, Figure 3B에 나타난 것과 같이 열처리 엑소좀(boiled exosome)은 유의한 세포 이주 유도활성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 피부각

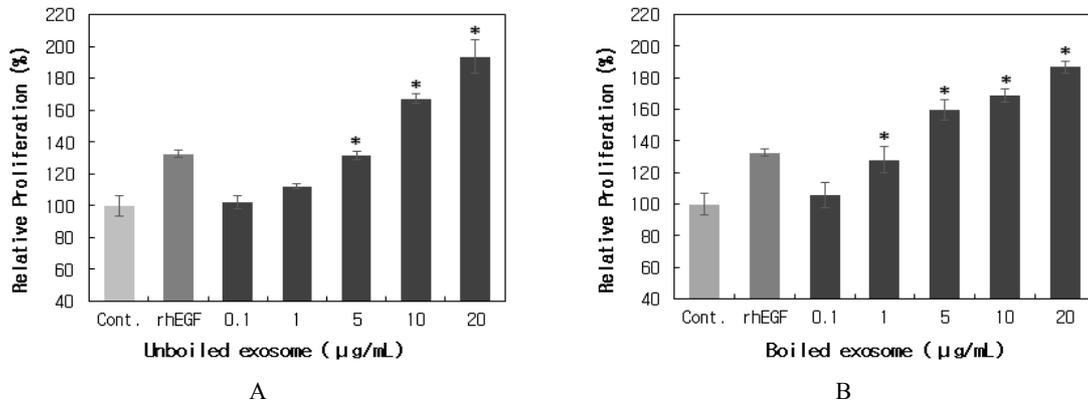


Figure 2. Effect of keratinocyte-derived exosome on keratinocyte proliferation. Cells were treated with unboiled exosome (A) or boiled exosome (B) for 48 h. Proliferation was examined by XTT assay. Cell proliferation in the quiescent state was considered as 100% (n = 3). Each value represents the mean ± S.E.M. Denotes a significant difference from cell proliferation in the quiescent state, with $p < 0.05$.

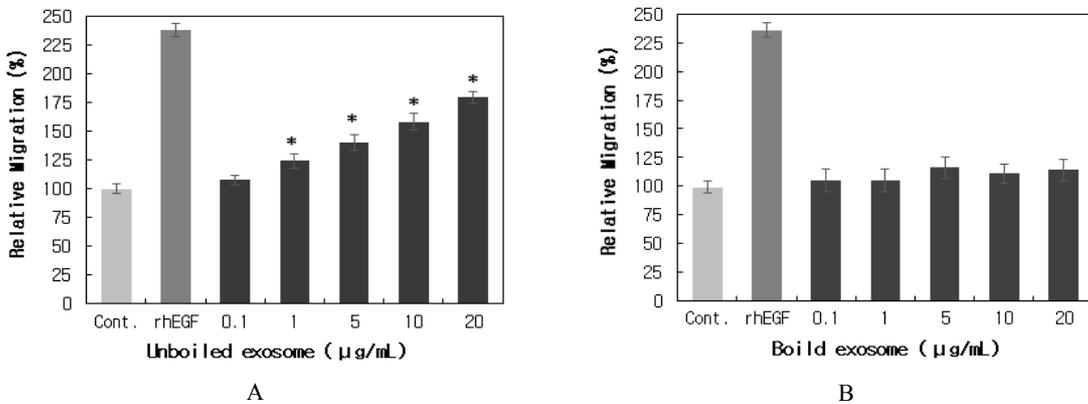


Figure 3. Effect of keratinocyte-derived exosome on keratinocyte migration. Cells were treated with unboiled exosome (A) or boiled exosome (B) for 3 h. Migration was quantified using a microchemotaxis chamber assay. Cell migration in the quiescent state was expressed as 100% (n = 4). Each value represents the mean ± S.E.M. Denotes a significant difference from cell migration in the quiescent state, with $p < 0.05$.

질형성세포 유래 엑소좀의 단백질 또는 열에 불안정한 구성성분이 세포 이주에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

3.4. 엑소좀이 피부각질형성세포 Collagen Sprout Out Growth에 미치는 영향

Collagen sprout assay는 3차원적인 세포의 증식과 이주 유도활성을 평가하는 실험 방법으로[18,19], 피부각질형성세포 유래 엑소좀의 증식 및 이주 유도 활성을 확인하였다. HaCaTs spot에 무처리 엑소좀(unboiled exosome)과 열처리 엑소좀(boiled exosome)을 각각 처

리하였으며, Figure 4A와 B에서 나타난 것과 같이 무처리 엑소좀이 sprout의 out growth 유도 과정에서 농도 의존적(0.1 ~ 20 µg/mL)인 반응을 나타내었다. 무처리 엑소좀은 1 µg/mL (125.17 ± 6.70%)에서 유의한 sprout의 out growth를 유도하였으며, 20 µg/mL에서 대조군에 비해 316.89 ± 5.84%의 out growth 유도 활성을 나타내어 양성대조군(342.09 ± 13.88%)과 유사한 활성을 나타내었다. 반면, Figure 4A와 C에서 나타난 것과 같이 열처리 엑소좀은 농도 의존적인 유도 활성을 나타내지 않았다.

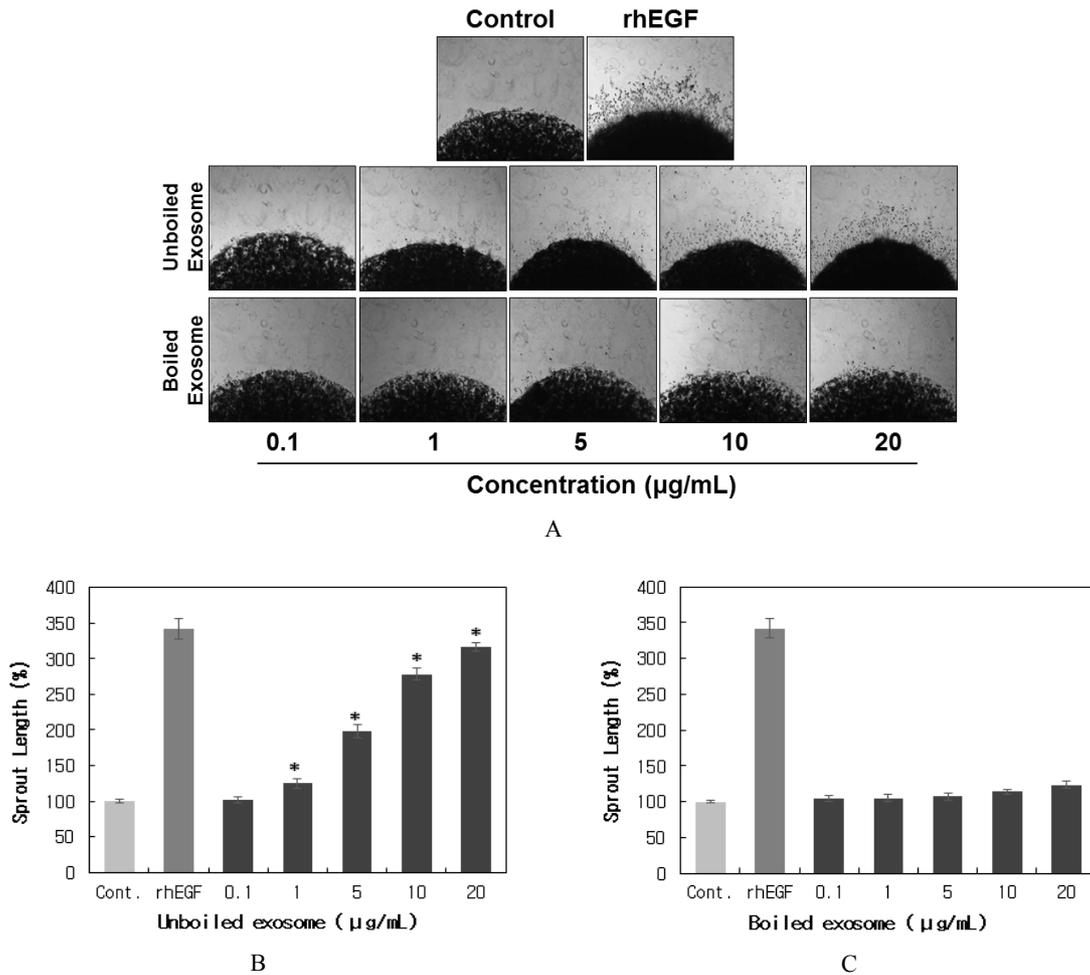


Figure 4. Effect of keratinocyte-derived exosome on keratinocyte sprout out growth. (A) Cells were mixed with collagen mixture and dropped on 24-well plate. (upper panel) Spots treated without any treatment (control) and with treatment of 50 ng/ml rhEGF (positive control). (lower panels) Spots treated with unboiled exosome or boiled exosome (0.1 ~ 20 µg/ml). Results were obtained on day 3. Spots and sprout out growth cells were stained with Diff-Quick solution and then images were obtained using microscopy (B, C). The statistical results obtained from panel (A) using NIH Image software. The level in control is expressed as 100% (n = 8). Each value represents the mean ± S.E.M. *Denotes a significant difference from the control, with $p < 0.05$.

4. 결 론

엑소솜은 조직 및 세포 종류에 따라 특이적으로 분리되는 생체 유래 나노사이즈 소포체(30 ~ 100 nm)를 의미하며, 면역세포 또는 암세포 유래 엑소솜이 면역 조절 및 신혈관형성 등 다양한 생리활성이 보고되어 왔다[2,4,7]. 현재까지 피부세포 유래 엑소솜의 피부재생 및 생리활성에 대한 연구는 진행되지 않았으나, 본 연구를 통해 피부세포 유래 엑소솜의 특징과 생리활성에 대한 일부를 확인하고 가능성을 제시하였다.

인체피부 유래 각질형성세포로부터 분리된 엑소솜의 피부각질형성세포 증식과 이주에 미치는 영향을 확인하였다. HaCaT 유래 무처리 엑소솜(unboiled exosome)은 농도 의존적으로 HaCaT의 증식과 이주 유도 활성을 나타내었으며, collagen sprout의 out growth를 실험을 통해 재확인 되었다. 열처리 엑소솜(boiled exosome)은 HaCaT의 증식을 유도하였으나, 이주 및 collagen sprout의 out growth 에는 유의한 활성이 나타나지 않았다. 이상의 결과를 통해서 HaCaT 유래 엑소솜은 지질 및 열에 안정한 물질이 각질형성세포의 증식을

유도하고, 단백질 또는 열에 불안정한 물질이 세포의 이동 및 sprout out growth 활성을 유도하는 것으로 해석할 수 있다. 그러나 엑소좀은 단백질, 지질, 핵산 등으로 구성되어 있어, 피부재생 이외의 다양한 기능을 나타낼 것으로 생각되어진다.

향후, 피부세포 유래 엑소좀의 특징과 피부생리활성에 대하여 추가적인 연구가 필요하며, 이를 통해 피부조직을 형성하는 세포-세포간 및 세포-기질 간의 상호작용 등을 이해함으로써 피부조직 연구에 대한 새로운 방향성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgment

본 연구는 2015년도 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 중소기업공동연구실 지원 사업(과제번호: N0001657)과 2016년도 산림청의 융·복합 기반 임산업의 신산업화 기술 개발(과제번호: 2016S1100010)로 수행된 연구결과임.

Reference

1. Y. H. Soung, T. Nguyen, H. Cao, J. Lee, and J. Chung, Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis, *BMB Rep.*, **49**(1), 18 (2016).
2. H. M. Lee, E. J. Choi, J. H. Kim, T. D. Kim, Y. K. Kim, C. Kang, and Y. S. Gho, A membranous form of ICAM-1 on exosomes efficiently blocks leukocyte adhesion to activated endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397**(2), 251 (2010).
3. K. Denzer, M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze, Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device, *J. Cell Sci.*, **113**(19), 3365 (2000).
4. M. Record, K. Carayon, M. Poirot, and S. Silvente-Poirot, Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1874**(1), 108 (2014).
5. J. S. Schorey, S. Bhatnagar, Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology, *Traffic*, **9**(6), 871 (2008).
6. A. Bobrie, M. Colombo, G. Raposo, and C. Thery, Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses, *Traffic*, **12**(12), 1659 (2011).
7. C. Thery, Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications, *F1000 Biol. Rep.*, **3**(15), 1 (2011).
8. G. Müller, Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases, *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **2012**(5), 247 (2012).
9. B. Zhang, M. Wang, A. Gong, X. Zhang, X. Wu, Y. Zhu, H. Shi, L. Wu, W. Zhu, H. Qian, and W. Xu, HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing, *Stem Cells*, **33**(7), 2158 (2015).
10. A. Lo Cicero, C. Delevoye, F. Gilles-Marsens, D. Loew, F. Dingli, C. Guéré, N. André, K. Vié, G. van Niel, and G. Raposo, Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation, *Nat. Commun.*, **24**(6), 7506 (2015).
11. S. Gibbs, C. Backendorf, and M. Ponc, Regulation of keratinocyte proliferation and differentiation by all-trans-retinoic acid, 9-cis-retinoic acid and 1, 25-dihydroxy vitamin D3, *Arch. Dermatol. Res.*, **288**(12), 729 (1996).
12. M. Xue, P. Thompson, I. Kelso, and C. Jackson, Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes, *Exp. Cell Res.*, **299**(1), 119 (2004).
13. I. Haase, R. Evans, R. Pofahl, and F. M. Watt, Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1-and EGF-dependent signalling pathways, *J. Cell Sci.*, **116**(15), 3227 (2003).
14. E. A. O'Toole, Extracellular matrix and keratinocyte migration, *Clin. Exp. Dermatol.*, **26**(6), 525 (2001).
15. T. L. Tuan, L. C. Keller, D. Sun, M. E. Nimni, and D. Cheung, Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels, *J. Cell Sci.*, **107**(8), 2285 (1994).
16. M. S. Yoon, K. J. Won, D. Y. Kim, D. I. Hwang,

- S. W. Yoon, B. Kim, and H. M. Lee, Skin regeneration effect and chemical composition of essential oil from *Artemisia Montana*, *Nat. Prod. Commun.*, **9**(11), 1619 (2014).
17. D. Y. Kim, K. J. Won, M. S. Yoon, D. I. Hwang, S. W. Yoon, J. H. Park, B. Kim, and H. M. Lee, *Chrysanthemum boreale* Makino essential oil induces keratinocyte proliferation and skin regeneration, *Nat. Prod. Res.*, **29**(6), 562 (2015).
18. D. Y. Kim, K. J. Won, M. S. Yoon, H. J. Yu, J. H. Park, B. Kim, and H. M. Lee, *Chrysanthemum boreale* flower floral water inhibits platelet-derived growth factor-stimulated migration and proliferation in vascular smooth muscle cells, *Pharm. Biol.*, **53**(5), 725 (2014).
19. D. Y. Kim, K. J. Won, D. I. Hwang, S. W. Yoon, S. J. Lee, J. H. Park, M. S. Yoon, B. Kim, and H. M. Lee, Potential Skin Regeneration Activity and Chemical Composition of Absolute from *Pueraria thunbergiana* Flower, *Nat. Prod. Commun.*, **10**(11), 2009 (2015).