

# HaCaT 각질형성세포에서 interferon-gamma에 의해 유도된 MDC와 STAT1 signaling pathway에 대한 renyolone의 억제 효과

강나진, 강경진, 한상철, 강희경, 유은숙

제주대학교 의학전문대학원 약리학교실

## Abstract

### Rengyolone inhibits MDC/CCL22 expression and STAT1 signaling pathway induced by interferon- $\gamma$ in HaCaT keratinocyte

Na-Jin Kang, Gyeong-Jin Kang, Sang-Chul Han, Hee-Kyoung Kang, Eun-Sook Yoo

Department of Pharmacology, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

Rengyolone is a cyclohexylethanoid isolated from the *Eurya emarginata* (Thunb.) Makino. It has been shown to exhibit antibacterial activity, anti-inflammatory, and diuretic. The aim of this study was to investigate the effective and activated mechanism by which renyolone inhibits IFN- $\gamma$ -induced MDC expression in the human keratinocyte cell line HaCaT. We found that renyolone dose dependently inhibited MDC production by IFN- $\gamma$  stimulation in HaCaT keratinocytes. Also renyolone suppressed IFN- $\gamma$ -induced phosphorylation of STAT1, a key transcription factor infiltrating IFN- $\gamma$  signaling pathway. Therefore We propose that Rengyolone could be used as a basis therapeutic material against atopic dermatitis. (J Med Life Sci 2012;9:64-68).

Key Words : renyolone, HaCaT, MDC, interferon- $\gamma$ , STAT1

## 서론

아토피 피부염은 가려움증을 특징으로 하는 대표적인 만성, 재발성의 염증성 피부질환으로, 알레르기성 비염과 기관지 천식과 함께 대표적으로 보이는 알레르기성 질환이다<sup>1,2</sup>. 현재까지 아토피 피부염의 정확한 원인을 규명하지는 못하고 있으나, 아토피 피부염은 환경적인 요소와 유전적인 소인, 면역학적 요인 등이 모두 관여하는 복합적인 질환으로 알려져 있다<sup>3</sup>. 그 밖에도 여러 세포들 (T lymphocyte, langerhans cells, keratinocytes)과 인자들 (사이토카인과 면역글로불린 특히 면역글로불린 E)이 아토피 피부염의 발생에 관여하는 것으로 보고되어 있다<sup>4</sup>.

여기에서 각질형성세포 (keratinocyte)는 각질층 구성에 필수적인 세포로 피부에서 발생하는 면역반응의 일차적인 유도체와 표적으로 작용한다. 이러한 각질형성세포는 여러 자극에 의해 tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) 등 다양한 사이토카인을 분비하고, Keratinocyte growth factor (KGF)의 수용체를 갖고 있어 이러한 사이토카인에 의해 영향을

받는다<sup>5</sup>. 또한, 아토피 피부염 환자의 각질형성세포에는 고농도의 thymic stromal lymphopoietin (TSLP)와 macrophage-derived chemokine/chemokine (C-C motif) ligand 22 (MDC/CCL22)가 존재하는데, 이러한 케모카인의 농도는 아토피 피부염과 밀접한 관련성을 가지고 있다<sup>6</sup>.

케모카인은 다양한 종류의 백혈구의 이동과 활성화를 조절하는 사이토카인으로 조직으로의 염증세포의 침윤을 조절한다<sup>7</sup>. 그 중에서 CC 케모카인은 특히 알레르기성 염증반응에서 호산구, 호염구, 림프구를 끌어들이는 작용을 한다고 알려져 있다. 실제로 아토피 환자의 혈청 내의 Thymus and Activation Regulated Chemokine (TARC)과 MDC의 농도는 상당히 높았다. 이 두 가지 케모카인은 IFN- $\gamma$ 에 의해 더 많이 발현되는데 IFN- $\gamma$ 는 T helper 1 (Th1) type 사이토카인으로 Th1 세포로의 분화 (differentiation)을 유도할 뿐만 아니라 interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-33와 같은 T helper 2 (Th2) type 케모카인 발현에도 영향을 미쳐 아토피피부염에서 IFN- $\gamma$ 의 중요성을 말해준다 (7,8). MDC는 CC 케모카인의 family로 화학주성인자로 알려져 있으며, 또한 단핵구, 자연 살해 세포 등에 대한 이주를 조절하는 케모카인으로 알려져 있다<sup>9,10</sup>.

IFN은 혼한 수용체와 결합한 단백질과 관련되었고, 중요 면역조절, 항증식성 그리고 항바이러스성 효과를 갖는다. IFNs는 직접적인 신호전달 체계를 이용한다. 사이토카인 수용체는 대개

Address for correspondence : Eun-Sook Yoo, PhD.  
Department of Pharmacology, Jeju National University School of Medicine, 102 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea  
E-mail : eunsyoo@jejunu.ac.kr

세포기질 부분의 효소 활성이 없다. 이러한 사이토카인 수용체에 결합할 때 janus kinase (Jak)과 같은 세포기질 내 티로신 인산화 효소와 결합한다. 이렇게 신호전달이 활성화되면, 활성화된 인산화 효소는 수용체 단백질의 티로신에 인산기를 붙이게 된다. Jak이 인산화 되고 이때 세포기질에 있던 유전자 조절 단백질인 signal transducer and activator of transcription (STAT1)이 수용체의 인산화된 티로신에 결합하게 되는데, 여기서 STAT은 IFN- $\gamma$ 에 의해 Jak에 의해 발현 되는 세포기질 내 전사 인자이다<sup>11</sup>. JAK은 이들을 인산화시킴으로써 활성화시킨다. 그 후 STAT은 수용체 단백질로부터 떨어져 나와서 이량체를 형성하고 핵 내로 이동하게 된다. 그 후 특정 유전자 전사가 활성화되면서 사이토카인, 케모카인과 같은 염증인자의 발현을 조절한다고 보고되었다<sup>12,13,14</sup>.

Rengyolone은 차나무과 (Theaceae)의 상록 관목으로 주로 제주도 및 따뜻한 도서지방의 바닷가에서 자라는 우목사스레피 (*Eurya emarginate* (Thunb.) Makino) 에도 함유된 것으로 보고되었다<sup>29</sup>. 또한 Rengyolone은 cyclohexylethanoid로써, 최근 항염증 활성을 갖는 물질로 보고되었다<sup>15,16</sup>. 하지만, 아토피 피부염과 관련된 염증성 케모카인인 MDC에 대한 Rengyolone의 억제 활성은 아직 보고된 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 Rengyolone이 HaCaT keratinocyte에서 IFN- $\gamma$ 로 유도되는 MDC 생성에 대한 억제 활성과 이와 관련된 작용기전을 알아보 고자 하였다.

## 재료 및 실험방법

### 1. 시약 및 시료.

본 연구에 사용한 시료는 제주대학교 화학과 이남호 교수님께 제공받은 우목사스레피에서 추출한 Rengyolone을 사용하였고, Rengyolone을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 100 mM로 희석하여 사용하였다. human interferon- $\gamma$  (hIFN- $\gamma$ , recombinant E. coli)는 GIBCO (Grand Island, NY)에서 구입 하여 사용하였다. 또한, MDC 생성은 human MDC ELISA duoset kit (R&D system, St.Louis, MO)을 구입하여 사용하였다. anti-STAT1은 Becton Dickinson (Sandiego, CA)에서 구입하였고, anti-phospho-STAT1은 Cell signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그리고  $\beta$ -actin은 Sigma로부터 구입하여 사용하였다. 또한 기타 시약들은 모두 1등급 시약들을 사용하였다.

### 2. 세포 배양

HaCaT 각질형성세포는 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS ; Gibco BRL)과 1%의 100X antibiotic (GIBCO, Grand Island, NY)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, USA)을 세포배양액으로 이용하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 로 유지되는 항온기 (Incubator)에서 배양하였다. 세포의 계대 배양은 세포 배양접시 (culture dish) 면적의 약 80% 정도를 차지할 때까지 배양하였고, 그 다음 0.05%의 트립신을 사용하여 세포를 배양 플라스크로부터 분리하였다. 그 다음에 10% FBS와

1% antibiotic이 포함된 배양액으로 트립신을 중화한 후, 원심 분리하여 계대 배양 하였다.

### 3. 세포 생존능 평가 (WST assay)

세포 생존능 평가를 보기 위하여, HaCaT keratinocyte (1x10<sup>5</sup>cells/mL)를 96well plate에 접종한 후 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>항온기에서 18시간 동안 배양하였다. 그 다음 interferon-gamma (IFN- $\gamma$ , 10 ng/mL)와 rengyolone을 각각 50, 100, 200  $\mu$ M의 농도로 no serum DMEM 배지에 처리하였다. 24시간 배양한 후 WST solution을 각각의 well에 5  $\mu$ l씩 넣고 2시간 동안 배양한 후, VersaMax ELISA microplate reader (Molecular Devices, CA)로 450 nm 필터에서 값을 측정하였다.

### 4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

MDC의 활성을 확인하기 위하여, HaCaT keratinocyte (2x10<sup>5</sup>cells/mL)를 96well plate에 접종하고, 세포를 18시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>항온기에서 배양하였다. 그 후 IFN- $\gamma$  (10 ng/mL)와 rengyolone (50, 100, 200  $\mu$ M)을 no serum DMEM 배지에 희석하여 처리하고, 24시간 동안 추가 배양하였다. 그 다음 각 well의 상층액을 human CCL22/MDC ELISA kit를 사용하여 정량하였다. 표준곡선 (standard curve)은 human MDC를 이용하여 1,000 pg/mL에서부터 1/2씩 순차적으로 희석하고 (serial dilution) 광학밀도는 450 nm 파장에서 VersaMax ELISA microplate reader로 분석하였다.

### 5. Western blot analysis

HaCaT keratinocyte를 60 mm culture plate에 5x10<sup>5</sup>cells/mL로 10% FBS DMEM 배지에서 18시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포는 각각 plate에 rengyolone을 50, 100, 200  $\mu$ M의 농도로 처리하여 2시간 배양하였다. 그 후 각 조건에 맞게 IFN- $\gamma$  (10 ng/mL)를 처리한 후 시간에 맞게 차가운 PBS로 2번 washing하여 protein lysis buffer (basic lysis beffer 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonident P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25  $\mu$ g/mL leupeptin)를 이용하여 단백질만 분리하였다. 샘플을 튜브에 모으고, 원심분리 (15000 RPM, 4°C, 15분)로 cell down한 후 상층액만 분리하였다. 단백질 정량은 bradford assay (bio-rad protein assay kit)를 통해 정량 하였고, gel에 동량의 단백질을 loading 하여 분리한 후, PVDF membrane에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane은 5% skin milk/PBST로 1시간 동안 실온에서 blocking한 후, 각각의 1차 항체 (STAT1 1:1000, pSTAT1 1:1000,  $\beta$ -actin 1:5000)를 4°C, overnight (O/N)하여 처리하였다. PBST로 washing한 후에 HRP-conjugated 2차 항체 (1:5000)를 실온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 그 다음 PBST로 washing 후 western blot detection kit을 이용하여 X-ray film에 감광시켜 결과를 확인하였다.

## 6. 통계 처리

각 실험군의 유의성 검정은 Student's T-test 분석을 이용하여 검정하였다. Western blot에서 측정된 density는 Image J를 사용하여 확인하였다.

## 결 과

### 세포 생존능에 대한 renyolone의 효과.

renyolone은 cyclohexylethanoid계 물질로, triterpenoids와 lignans 그리고 glycosides의 구조를 갖고 있다<sup>17,18,19</sup>(Fig 1).

세포에 renyolone을 처리하여 활성 평가에 들어가기에 앞서, renyolone이 세포 생존능에 영향을 주는지 확인해 보았다. 세포에 IFN- $\gamma$  (10 ng/mL)와 함께 renyolone을 농도별로 처리하여

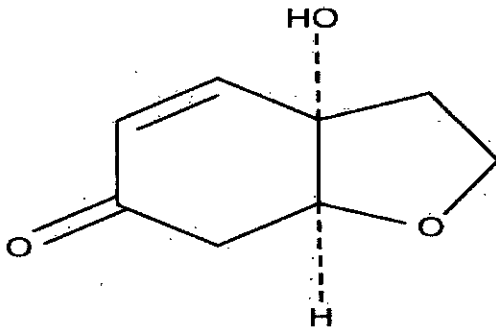


Figure 1. Chemical structure of renyolone

24시간 동안 배양하였고, WST assay로 세포의 독성을 측정하였다. 그 결과 renyolone이 세포 생존능에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig 2).

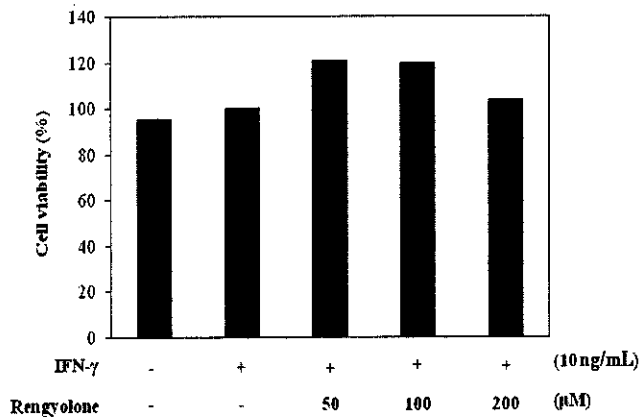


Figure 2. Effect of renyolone on the cell viability in HaCaT human keratinocytes.

Cells were pre-incubated for 18 hrs, and cell viability was determined from the cells treated with renyolone (50, 100, 200  $\mu$ M) for 24 hrs. Cell viability was determined by WST assay.

### MDC 단백질 생성에 대한 renyolone의 효과.

renyolone의 MDC 억제효능을 확인하기 위하여 ELISA를 이용하여 MDC의 생성을 확인하였다. 일반세포군에서는 51.4  $\pm$  0.12 pg/mL의 MDC 생성량이 나타났고, IFN- $\gamma$  (10 ng/mL)를 처리한 대조군에서는 221.1  $\pm$  9.12 pg/mL의 MDC가 생성되었으며, 이는 일반세포군보다 약 4배정도의 생성량 차이를 나타냈다. renyolone을 50, 100, 200  $\mu$ M의 농도로 처리하였을 때, 50  $\mu$ M에서는 163.9  $\pm$  11.01 pg/mL, 100  $\mu$ M에서는 110.6  $\pm$  11.67 pg/mL 그리고 200  $\mu$ M에서는 41.1  $\pm$  2.46 pg/mL 생성수치로 IFN- $\gamma$ 를 처리한 군의 MDC 생성수치에 비하여 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 대조군에 비하여 renyolone을 처리한 군에서 농도 의존적으로 MDC의 발현이 억제된 것을 확인할 수 있었다. 특히 100  $\mu$ M (110.6  $\pm$  11.67 pg/mL), 200  $\mu$ M (41.1  $\pm$  2.46 pg/mL) 농도에서 대조군에 비교하였을 때 유의적으로 감소한 수치가 나타났다. 즉, renyolone을 200  $\mu$ M의 농도로 처리하였을 때, MDC 양을 억제하는 것으로 보아 renyolone이 염증 억제와 관련하여 영향을 미치는 것으로 생각된다 (Fig, 3).

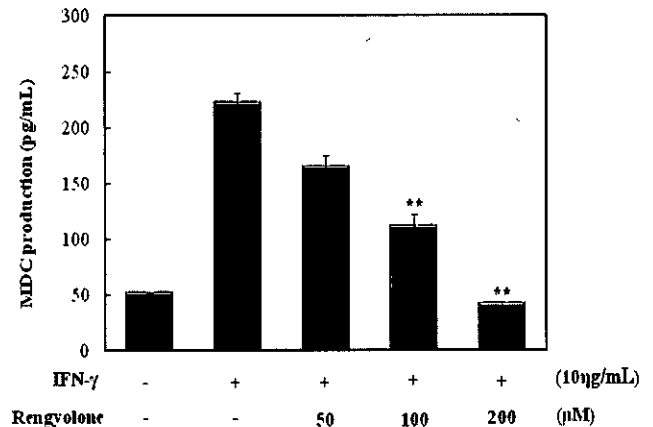


Figure 3. Effect of renyolone on the protein production of MDC in HaCaT human keratinocytes.

Cells ( $2.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18 hrs, and MDC production was determined from the culture supernatant of cells stimulated by IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) in the presence of renyolone (50, 100, 200  $\mu$ M) for 24 hrs. MDC production was measured by ELISA. The measurements of MDC were done in triplicate. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three experiments. \*\*p<0.01 compared to the IFN- $\gamma$  alone.

### STAT1의 인산화에 대한 Renyolone의 효과.

IFN- $\gamma$ 를 세포에 자극하였을 때 나타나는 주된 신호전달과정은 Jak/STAT 신호전달기전이다. 위 Fig. 3의 data에서 renyolone이 MDC 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서 우리는 renyolone이 어떠한 작용기전을 통해서 활성을 억제하는지 확인하고자 IFN- $\gamma$ 신호전달 경로인 Jak/STAT pathway에 대한

rengyolone의 영향을 western blot으로 확인하였다. HaCaT keratinocyte에 rengyolone을 200  $\mu$ M을 처리하여 2시간 동안 배양한 후, IFN- $\gamma$  (10 ng/mL)를 처리하여 각 시간대별로 단백질을 분리 하여 STAT1의 인산화 정도를 확인하였다. 그 결과, IFN- $\gamma$  자극에 의해서 STAT1의 인산화가 5분부터 증가하였으며, 15분째에 가장 증가하였다. 반면에, rengyolone을 전 처리했을 때는 IFN- $\gamma$ 로 유도되는 STAT1의 인산화가 감소하였다 (Fig. 4).

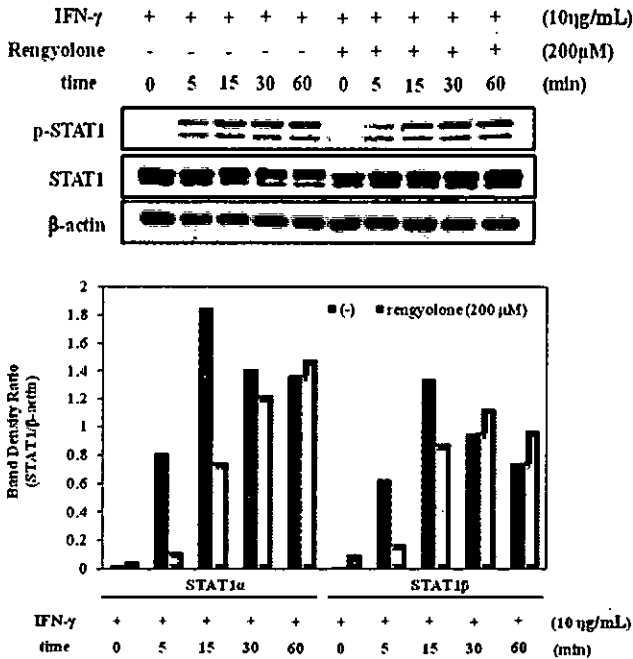


Figure 4. Effect of rengyolone on the phosphorylation of STAT1 in HaCaT human keratinocytes. Cells ( $5.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18 hrs. The cells were pre-treated with rengyolone (200  $\mu$ M) for 2 hrs and then stimulated with IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) for indicated time. The phosphorylation and total forms of STAT1 and  $\beta$ -actin were determined using western blotting method.

**고찰**

아토피 피부염의 발생률의 증가에 영향을 미치는 요인으로는 대기 오염, 핵가족화, 수입과 교육수준의 증가, 항생제 사용의 증가로 인한 항원에 대한 노출의 증가, 주거환경 변화, 공업 발달로 인한 새로운 항원물질의 등장 등이 관여하는 것으로 생각되어진다<sup>17)</sup>.

아토피 피부염에서 각질형성세포와 MDC의 관련성을 연구한 보고에 따르면 각질형성세포 중에서 Human adult low-calcium high-temperature (HaCaT) 세포는 형질전환 된 인간 각질형성 세포주로, HaCaT 세포에 IFN- $\gamma$ 를 자극하면 MDC가 분비된다는 보고가 있다<sup>20,21)</sup>. 그리고 HaCaT keratinocyte에서 NF- $\kappa$ B와

STAT1의 신호전달기전을 차단하여 TARC와 MDC를 억제하며, p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) pathway를 통한 NF- $\kappa$ B 활성을 억제하여 HaCaT 세포에 IFN- $\gamma$ 를 자극하여 유도된 MDC의 생성이 억제되었다는 보고도 있었다<sup>17,22)</sup>. 따라서 이러한 연구들은 HaCaT keratinocyte에 IFN- $\gamma$ 를 자극하면 아토피 피부염과 관련된 케모카인인 MDC가 다량 생성되며, 이러한 MDC 생성이 STAT1 pathway를 통한 기전뿐만 아니라 다양한 신호전달기전을 통하여 생성되는 것을 시사 한다고 할 수 있다. 이에 본 연구에서는 각질형성세포인 HaCaT keratinocyte에 IFN- $\gamma$ 를 자극하여 MDC의 생성과 STAT1 인산화의 발현을 유도하고, rengyolone이 MDC 생성과 STAT1 인산화 신호전달을 억제하는 효과를 갖는지를 조사하였다.

우선 HaCaT keratinocyte에 rengyolone을 각 50, 100, 200  $\mu$ M의 세포 생존능에 영향이 없는 각 농도로 처리한 후 IFN- $\gamma$ 로 자극해서 MDC를 유도하여 MDC 억제 효과를 확인하였다. 그 결과 200  $\mu$ M에서 대조군과 비교하였을 때 유의적으로 MDC 생성량을 억제하는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 즉, rengyolone이 IFN- $\gamma$ 로 유도된 아토피 피부염과 관련된 인자인 MDC를 억제하는 것을 알 수 있었다. 앞선 결과에서 rengyolone이 IFN- $\gamma$  자극으로 유도되는 MDC의 생성에 대한 억제활성을 확인하였다. 따라서 이전 rengyolone의 작용기전을 확인하고자 IFN- $\gamma$  신호전달 경로 중 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 STAT1에 대한 rengyolone의 영향을 확인하였다. 앞선 결과에서 가장 높은 억제 효과를 보였던 농도인 200  $\mu$ M의 rengyolone을 세포에 전 처리한 후, IFN- $\gamma$ 를 처리하여 시간대별로 확인한 결과, IFN- $\gamma$ 를 처리하고 5분이 지났을 때의 STAT1의 인산화가 가장 높은 억제 효과를 보였다 (Fig 4). 그러나 ELISA를 통하여 확인한 MDC 억제 효과보다 western blot을 사용하여 측정한 STAT1의 신호전달기전은 적은 억제 효과를 보였다. 이러한 결과를 보았을 때, MDC 생성량을 확인할 때와 STAT1 신호전달 경로를 확인할 때 rengyolone 처리시간 차이가 있었고, MDC 억제 활성에 비해 STAT1 인산화에 대한 억제활성이 적었다. 이는 MDC 생성과 관련된 다른 신호전달 경로에도 영향을 주었기 때문일 수 있다. 따라서 rengyolone이 MDC와 STAT1 신호전달기전 외에도 아토피 피부염과 관련된 다른 인자인 TARC 또는 NF- $\kappa$ B 신호전달기전 억제 효과를 가질 것인지에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

이에 본 연구에서 사용한 시료인 rengyolone은 아토피 피부염과 관련된 인자인 MDC와 STAT1 인산화 신호전달 과정을 억제하는 물질 또는 아토피 피부염 예방 및 치료에 있어서 성분의 분리와 작용기전 연구에 관한 기초자료로서 관련된 물질로 활용 가능 할 것으로 사료된다.

**참고 문헌**

1) Sturgill S, Bernard LA. Atopic dermatitis update. Curr Opin Pediatr 2004 Aug;16(4):396-401.

- 2) Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003 Jan 11;361(9352):151-160.
- 3) Sandstrom MH, Faergemann J. Prognosis and prognostic factors in adult patients with atopic dermatitis: a long-term follow-up questionnaire study. *Br J Dermatol* 2004 Jan;150(1):103-110.
- 4) Leung DY, Soter NA. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2001 Jan;44(1 Suppl):S1-S12.
- 5) Maeda S, Yanagihara Y. Inflammatory cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13). *Nihon Rinsho* 2001 Oct;59(10):1894-1899.
- 6) Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002 Jul;3(7):673-680.
- 7) Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006 Jul;118(1):178-189.
- 8) Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* 2004 Dec;4(12):978-988.
- 9) Maeda S, Fujiwara S, Omori K, Kawano K, Kurata K, Masuda K, et al. Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2002 Sep 6;88(1-2):79-87.
- 10) Shimada Y, Takehara K, Sato S. Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2004 May;34(3):201-208.
- 11) Han SK, Song JY, Yun YS, Yi SY. Gamma irradiation-reduced IFN-gamma expression, STAT1 signals, and cell-mediated immunity. *J Biochem Mol Biol* 2002 Nov 30;35(6):583-589.
- 12) Ivashkiv LB, Hu X. Signaling by STATs. *Arthritis Res Ther* 2004;6(4):159-168.
- 13) Best SM, Morris KL, Shannon JG, Robertson SJ, Mitzel DN, Park GS, et al. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J Virol* 2005 Oct;79(20):12828-12839.
- 14) Zhang Y, Gui J. Molecular characterization and IFN signal pathway analysis of *Carassius auratus* CaSTAT1 identified from the cultured cells in response to virus infection. *Dev Comp Immunol* 2004 Mar;28(3):211-227.
- 15) Kitagawa S, Nishibe S, Baba H. Studies on the Chinese crude drug "forsythiae fructus". VIII. On isolation of phenylpropanoid glycosides from fruits of *Forsythia koreana* and their antibacterial activity. *Yakugaku Zasshi* 1987 Apr;107(4):274-278.
- 16) Jensen SR, Franzky H, Wallander E. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry* 2002 Jun;60(3):213-231.
- 17) Wollenberg A, Kraft S, Opiel T, Bieber T. Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms. *Clin Exp Dermatol* 2000 Oct;25(7):530-534.
- 18) Kim JH, Kim DH, Baek SH, Lee HJ, Kim MR, Kwon HJ, et al. Rengyolone inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by down-regulation of NF-kappaB and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol* 2006 Apr 14;71(8):1198-1205.
- 19) Kang HS, Lee JY, Kim CJ. Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae Fructus*. *J Ethnopharmacol* 2008 Mar 5;116(2):305-312.
- 20) Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988 Mar;106(3):761-771.
- 21) Horikawa T, Nakayama T, Hikita I, Yamada H, Fujisawa R, Bito T, et al. IFN-gamma-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *Int Immunol* 2002 Jul;14(7):767-773.
- 22) Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Li JH, Jin D, Teng YC, et al. Fluvastatin inhibits expression of the chemokine MDC/CCL22 induced by interferon-gamma in HaCaT cells, a human keratinocyte cell line. *Br J Pharmacol* 2009 Aug;157(8):1441-1450.
- 23) TH Oh, JS Baik, ES Yoo, HK Kang, and NH Lee. New Phenylpropanoid Glycosides from *Eurya emarginata* (Thunb.) Makino. *Bull. Korean Chem.* 2011 May;32(8): 3175-3178.