

## Effect of Chlorella Growth Factor on the Proliferation of Human Skin Keratinocyte

Yong-Ho Kim<sup>†</sup>, Yoo-Kyeong Hwang, Yu-Yon Kim, Su-Mi Ko,  
Jung-Min Hwang and Yong-Woo Lee

Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Kimhae 621-749

Chlorella is rich in chlorella growth factor (CGF). A review of the literature has described that CGF improves the capability of a Th1-based immunity, anticancer, antioxidant, antibacterial activity, growth promotion, wound healing and so on, but has not studied the effect for the metabolism and the proliferation of human skin keratinocyte. The aim of this study was to examine the effect of metabolism and the proliferation of human skin keratinocyte in vitro. CGF was extracted with an autoclaving method which is a modified hot-water extraction method from dried chlorella and confirmed by means of absorbance 0.22 at 260 nm. We have measured the extracellular acidification rate (ECAR) of the CGF by Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer and evaluated responsiveness depending upon the dosage on the HaCaT cell. The ECAR for the concentrations of 0.15, 1.5, 15, 150 µg/ml of CGF increased as a 103.6, 128.2, 149.0 and 423.9%, respectively compared to control (0.0 µg/ml, 100% ECAR). The ECAR for ErbB1 tyrosine kinase inhibited by 4-anilinoquinazolines, C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · HCl on the HaCaT cells with the amounts of 10 µg/ml of the CGF compared with 100 ng/ml of rhEGF. The conclusion of the study is that CGF might increase human epidermal keratinocyte proliferation through the interaction between the epidermal growth factor receptor and itself.

**Key Words:** Chlorella growth factor (CGF), Human epidermal keratinocyte, HaCaT cell, Epidermal growth factor receptor (EGFR), Proliferation, Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer

### 서 론

Chlorella는 Chlorella과 (科)에 속하는 직경 2~10 µm 단세포 미세조류 (藻類: algae)로 1890년 Beyerink B.W.에 의해 처음 분리·배양·명명되었다<sup>1,2,18</sup>. 1940년대 미세조류의 산업적 이용에 대한 연구가 본격화되면서 녹조류 (綠藻類: Chlorophyta)인 chlorella에 대한 연구도 광범하게 이루어지게 되었고, 근래에는 미세조류에 함유되어 있거나 생산하는 생리활성물질을 탐색·분리·정제하여 산업적으로 이용하는 algal biotechnology가 발전하면서 chlorella의 유효성분을 분리·정제하여 그 약리작용 및 작용기전을 밝히기 위한 연구들도 활발히 진행되고 있다<sup>6,10,14,16,17,22,25,27,28,31,32,36,38</sup>. 특히 chlorella에는 세포, 동식물의 성장을 촉진시키는 것으로 알려진 chlorella growth factor (이하 CGF)를 함유하고 있다. CGF는 chlorella가

세포분열을 할 때 만들어지는 물질로, 세포분열 뿐만 아니라 세포 및 동식물의 성장을 촉진하고, 상처치유작용과 면역증진작용을 하는 점에서 CGF가 EGF와 유사하게 세포의 성장 증식 촉진작용을 할 것이라고 생각되지만 아직 CGF의 약리작용 및 작용기전과 사람의 표피세포의 대사와 증식에 미치는 효과에 대하여 연구·보고된 바는 없다.

따라서 본 연구에서는 chlorella가 EGF와 유사하게 epidermal growth factor receptor (ECAR)의 ligand로 작용함으로써<sup>11,13,20,24</sup> 사람각질형성세포의 대사 및 증식을 촉진시킬 것이라고 가정하고, 건조 chlorella로부터 CGF를 추출하고, 그 특성을 분석한 후, 이를 이용하여 in vitro에서 사람각질형성세포의 대사 및 증식에 미치는 영향을 사람각질형성세포주인 HaCaT cells과 Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer를 이용하여 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. Chlorella growth factor 조제

CGF는 건조 chlorella를 분쇄한 후 chlorella의 함량이 10% (w/v)가 되도록 pH 7.4 PBS를 첨가하여 autoclave (Auto Clave

\*는 문 접수: 2002년 10월 15일

수정 접수: 2002년 11월 28일

<sup>†</sup>별책 요청 저자: 김용호, (우) 621-749 경남 김해시 어방동 607번지, 인제대학교 임상병리학과

Tel: 055-320-3481, Fax: 055-334-3426

e-mail: mlskimyh@ijnc.inje.ac.kr

KMC-1221, Vision Scientific Co., Ltd., Korea)에서 121°C, 20분간 고온고압 상태에서 열수추출한 다음 3600 g, 4°C, 60분 동안 원심분리한 상층액을 얻어 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 흡광도가 0.22임을 확인한 후 이용하였다.

## 2. HaCaT cells 배양

HaCaT cells (transformed human keratinocyte cell line)은 Dr. N. Fusening (German cancer research center) 및 박경찬 교수 (서울의대)로부터 분양 받았으며, 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 100 U/ml penicillin (Gibco, USA), 100 µg/ml streptomycin (Gibco, USA)이 첨가된 DMEM (Gibco, USA)을 배지로 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다<sup>19,30</sup>.

## 3. CGF 농도별 세포수 측정

HaCaT cell은 6 well culture plate (Costar, USA)에 5×10<sup>4</sup> cells/well 씩 inoculation 하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 동안 inoculation한 후 complete media에 CGF를 각각 0, 0.015, 0.15, 1.5, 15, 150 µg/ml 농도가 되도록 조제해 각 well 당 3.0 ml 씩 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 4일 동안 inoculation한 hemacytometer (Improved Neubauer, BRAND, USA)를 이용하여 세포수를 계산하였다<sup>9</sup>.

## 4. Extracellular acidification rate 측정

Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer (Molecular Device, USA)용 cell capsule (capsule cup, Molecular Device, USA)에 3×10<sup>5</sup> cells/ml HaCaT cells을 inoculation 시켰으며, running buffer로는 4 M NaCl이 11.1 ml/l 첨가된 bicarbonate free DMEM (Gibco, USA) 배지를 이용하였다. Extracellular acidification rate (이하 ECAR) 측정용 electrode는 2 M KCl (Molecular Device, USA)로 충전시키고, sensor chamber는 37°C, debubbler는 46°C로 설정하였다. 총 pump cycle은 2분으로 하였으며, stop measurement 시간은 30초로 하였다.

Pump speed는 100 µl/min (pump speed 50%)으로 하였으며, fluid schedule은 interval start 20분, interval duration 10분으로 설정하였다.

## 5. 농도별 ECAR 측정

각 chamber 당 45 ml의 running buffer를 장착한 후 20분간 running media 상태에서 ECAR을 측정하여 base line을 설정한 후 CGF를 0.15, 1.5, 15, 150 µg/ml의 농도로 처리하였다.

## 6. EGFR tyrosine kinase inhibitor 처리 후 CGF에 대한 ECAR

초기 40분간 base line을 설정한 후 150 µg/ml의 CGF를 투

여해 10분간 ECAR을 측정하였고, 다시 20분간 running buffer로 basal metabolism을 유지한 후 25 pM PD153035 hydrochloride (4-anilinoquinazolines, C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · HCl, Tocris Cookson, Bristol, UK)를 처리하였으며, 연속해서 150 µg/ml의 CGF를 투여해 ECAR을 측정한 후 다시 running buffer를 흘려 주었다.

## 7. EGFR tyrosine kinase inhibitor 처리 후 CGF와 rhEGF의 ECAR 비교

3×10<sup>5</sup> cells/ml HaCaT cells을 inoculation한 두 개의 chamber를 running buffer 하에서 20분간 ECAR을 측정하여 base line을 설정한 후 25 pM PD153035 hydrochloride를 20분간 반응시키고, 연속해서 150 µg/ml의 CGF와 100 ng/ml rhEGF (Promega, USA)를 각각 10분간 처리하여 ECAR을 측정한 후 다시 running buffer를 흘려 주었다.

## 결 과

### 1. 농도별 세포수 측정

5×10<sup>4</sup> cells/well의 HaCaT cell에 CGF를 각각 0.015, 0.15, 1.5, 15, 150 µg/ml 처리한 후 세포수를 계산한 결과 대조군은 6.6×10<sup>5</sup> cells/well 이었고, 0.015, 0.15, 1.5, 15, 150 µg/ml 처리한 실험군은 각각 8.1×10<sup>5</sup>, 1.03×10<sup>6</sup>, 1.14×10<sup>6</sup>, 8.5×10<sup>5</sup>, 2.1×10<sup>5</sup> cells/well로 대조군에 대한 백분율로 각각 122.7, 156.0, 172.7, 128.8, 31.8%로 나타나 CGF 농도가 1.5 µg/ml까지는 세포수가 증가하는 농도의존성 세포증식률을 나타내었으나, 그 이상의 농도에서는 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 1).

### 2. 농도별 ECAR 측정

CGF를 투여하지 않은 대조군의 ECAR을 100%로 설정한 후 CGF 투여군을 비교해 본 결과 0.15, 1.5, 15, 150 µg/ml을 투여한 군에서의 ECAR은 각각 103.6, 128.2, 149.0, 423.9%로 증가함을 보였다 (Fig. 2).

### 3. EGFR tyrosine kinase inhibitor 처리 후 CGF에 대한 ECAR

40분간 cell을 안정화시키면서 base line을 설정한 후 150 µg/ml의 CGF를 투여한 결과 423.9%까지 ECAR이 증가하였으며, 다시 running buffer를 흘려 주었을 때 basal metabolism 상태를 보였다. 20분간 basal metabolism을 유지한 후 25 pM PD153035 hydrochloride를 20분 동안 처리한 결과 약 75%까지 ECAR이 떨어졌고, 연속하여 150 µg/ml의 CGF를 10분간 투여하였을 때에도 ECAR은 5% 이내의 증가율을 보였으나, 다시 running buffer를 흘려 주었을 때 basal metabolism을 회복하였다 (Fig. 3).

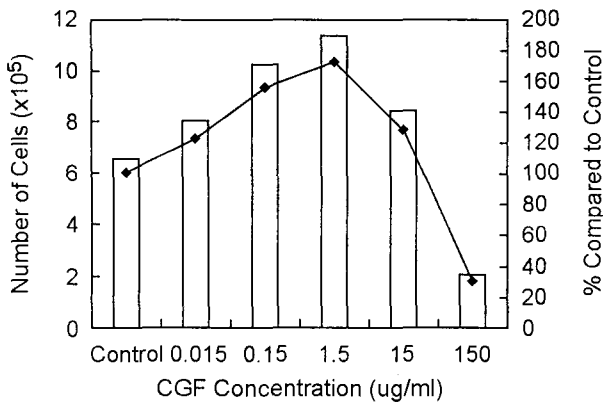


Fig. 1. Increased of HaCaT cells depend upon the concentration of the CGF. Bar: the number of cell count.

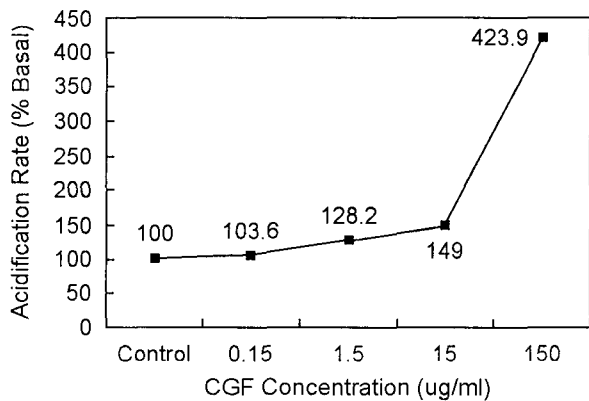


Fig. 2. Extracellular acidification rate of the HaCaT cells in response to concentration of CGF on Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer. The peak value of acidification rate (% basal) following a 10 min perfusion of the ligands is plotted against the different concentration ranging from 0.15 to 150  $\mu$ g/ml of CGF.

#### 4. EGFR tyrosine kinase inhibitor 처리 후 CGF와 rhEGF의 ECAR 비교

20분간 cell을 안정화시키면서 base line을 설정한 후 25 pM PD153035 hydrochloride를 처리한 결과 base line에 비하여 ECAR이 각각 75, 200%까지 감소하였고, 연속하여 150  $\mu$ g/ml의 CGF와 100 ng/ml rhEGF를 한 결과 ECAR은 각각 5, 50%의 증가율을 보였으며, 다시 running buffer를 흘려 주었을 때 basal metabolism을 회복하였다 (Fig. 4).

#### 고 찰

CGF가 사람표피세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보기 위해 표피 (epidermis)의 90% 이상을 차지하면서 표피의 대사 및 증식, 면역반응을 담당하는 각질형성세포 (keratinocyte)를 재료로 이용하였으며<sup>2,21)</sup>, Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer를 이

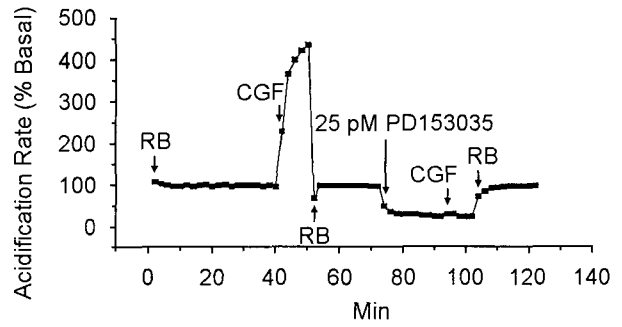


Fig. 3. Differential cellular metabolism between EGFR uninhibited and inhibited HaCaT cells with 25 pM PD153035 of the CGF. RB: running buffer, CGF: chlorella growth factor 150  $\mu$ g/ml, PD153035: ErbB1 tyrosine kinase inhibitor.

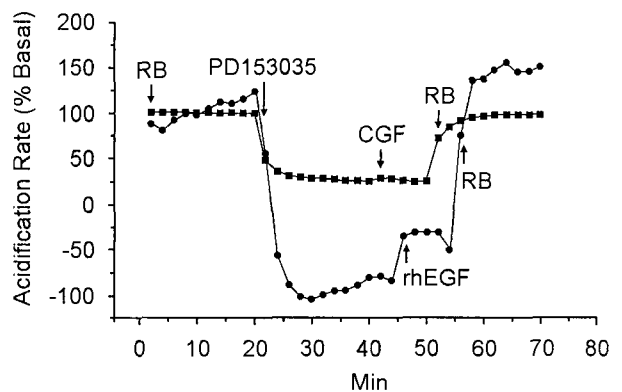


Fig. 4. Metabolic responses for the CGF and rhEGF on the HaCaT cells which inhibited ErbB1 tyrosine kinase by PD153035 hydrochloride. RB: running buffer, PD153035: ErbB1 tyrosine kinase inhibitor, CGF: chlorella growth factor 150  $\mu$ g/ml, rhEGF: recombinant human epidermal growth factor 100 ng/ml.

용하여 사람각질형성세포 HaCaT cell의 EGFR에 대한 CGF의 receptor-ligand 반응을 살펴보았다. EGFR family는 intrinsic tyrosine kinase activity를 갖는 170 kDa의 transmembrane receptor로, 유사한 구조를 갖는 ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4로 구성되어 있으며, extracellular ligand binding domain (23 amino acid), cytoplasmic catalytic domain (542 amino acid)으로 구성되어 있다<sup>20)</sup>. 그 중에서도 EGF의 signaling에 관여하는 것은 ErbB1 tyrosine kinase로 extracellular domain에 ligand가 결합하면 receptor의 dimerization이 일어나 cytoplasmic domain이 tyrosine kinase activity를 가지게 되고, target 단백질의 tyrosine 잔기가 인산화되어 postreceptor signaling이 일어나게 되며, postreceptor signaling 과정에서 H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 이온의 변화가 수반된다. 이로 인하여 intracellular pH 농도가 변하게 되는데 세포는 항상성 유지를 위하여 membrane bound sodium-hydrogen exchanger (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport)를 통하여 H<sup>+</sup> 이온을 세포외로 방출하게 된다<sup>2,29)</sup>. Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer는 이렇게 방출된 수소이온의 농도 변화율을 ligand addressable potentiome-

tric sensor (이하 LAPS)를 이용해 측정함으로써 HaCaT cell에 대한 CGF, rhEGF, EGFR inhibitor의 반응성을 나타내었다<sup>3,4, 20,21,23,24</sup>.

본 실험에 앞서 Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer 상에서 사람 각질형성세포에 대한 rhEGF의 최적반응 조건을 확립한 후 그 결과를 본 실험의 조건으로 설정하였다. 사람표피세포 HaCaT cell의 in vitro 배양실험과 Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer 상에서의 농도별 성장실험을 실시한 결과 in vitro 배양실험의 경우 1.5 µg/ml CGF를 처리했을 때까지는 세포수가 비례적인 증가를 보였으나, 15 µg/ml 이상의 농도에서는 세포수가 감소한 것을 알 수 있었다. 이에 비해 Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer 상의 농도별 성장실험에서는 대조군의 ECAR 100%와 비교하여 0.15, 1.5, 15 µg/ml CGF 처리군에서 각각 103.6, 128.2, 149.0%로 완만한 증가를 보이다가, 150 µg/ml 처리에서 423.9%로 급격한 증가율을 나타내었다. In vitro 배양실험과 Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer를 이용한 농도별 ECAR 측정실험의 15, 150 µg/ml 농도에서 상이한 반응을 보인 것은 in vitro 배양실험이 4일 동안의 장기간 반응인 반면, Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer를 이용한 경우는 10분간의 단기간 자극에 대한 반응이며, in vitro 배양실험은 4일간 증식한 세포수를 측정하였으나, Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer에서는 세포대사에 대한 ECAR을 측정한 결과라는 점에서 야기될 수 있는 차이점이라고 생각된다. 이를 통해 CGF가 1.5 µg/ml 이하의 농도에서는 단기간 투여시 사람각질형성세포를 자극할 수 있지만, 장시간 투여시 오히려 성장·증식 저해 효과를 나타낼 수 있었다. 또한 Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer의 150 µg/ml 처리에서 423.9%로 급격한 ECAR 증가율을 보인 것은 용량과다에 의한 독성대사의 효과가 함께 반영된 것이라고 생각된다.

표피의 대사 및 증식은 각질형성세포를 비롯하여 랑게르한스세포, 진피의 섬유모세포, 혈액중의 과립구, 비만세포 등이 분비하는 cytokine을 포함한 각종 growth factors들에 의해 조절되어 표피화 및 교원질의 합성, 상피세포의 이동과 재배열, 혈관신생들을 촉진시킨다. 그 중에서도 EGF는 in vivo, in vitro에서 모두 각질형성세포 (keratinocyte)와 섬유모세포 (fibroblast)의 유사분열을 촉진시켜 표피세포의 증식을 주도한다고 보고되고 있다<sup>11,13,20,34</sup>. 본 실험에서는 CGF의 효능으로 알려진 동물성장촉진, 상처회복촉진, 면역력증진 등이 EGF의 효능과 유사하다는 점에 착안하여 CGF가 각질형성세포에서 EGF와 유사하게 EGFR을 통하여 반응할 것이라고 가정하고 이를 검증하기 위하여 Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer 상에서 HaCaT cell의 EGFR에 대한 CGF의 반응을 rhEGF와 비교해서 살펴보았다.

EGFR inhibitor를 처리하기 전·후의 HaCaT cell에 대한 CGF의 반응을 비교해 본 결과 ErbB1 tyrosine kinase의 inhibitor

인 PD153035 hydrochloride (4-anilinoquinazolines, C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · HCl)의 effective concentration 50 이하 (EC<sub>50</sub>) 농도 25 pM을 처리하기 전 HaCaT cell에 대한 150 µg/ml CGF의 반응률은 base line에 비해 최고 336.02% 증가하였으나, PD153035 처리 후 동일 농도의 CGF에 대한 ECAR 증가율은 3.98%를 나타내 PD153035 hydrochloride 처리 후 CGF가 세포반응을 거의 유발하지 못함을 확인할 수 있었다.

다음으로 rhEGF와 CGF의 반응을 비교하기 위해 PD153035 hydrochloride로 HaCaT cell의 EGFR을 blocking한 후 CGF와 rhEGF의 ECAR을 확인하였다. 그 결과 100% basal metabolism과 비교해 PD153035 hydrochloride를 처리한 후 CGF 처리군은 28.38%, rhEGF 처리군은 -91.05%로 ECAR이 basal metabolism 이하로 떨어져 반응정도의 차이는 보였으나 그 반응 패턴이 유사함을 알 수 있었다<sup>4,15,24,26</sup>.

본 실험을 통해 running buffer 조건의 basal metabolism 상태에서 cell의 ECAR을 base line으로 생각했을 때 EGFR inhibitor로 알려진 PD153035 hydrochloride를 처리한 경우 ECAR이 base line 보다 떨어짐을 확인할 수 있었고, EGFR에 의해 세포반응을 유발한다고 알려진 rhEGF를 처리한 경우 ECAR의 증가를 보였다. 본 실험에서 CGF를 처리한 경우 EGF와 마찬가지로 ECAR 증가를 보였다는 점은 CGF가 표피세포대사를 촉진시킨다는 것을 말해 주었다. 다음으로 PD153035 hydrochloride에 의해 ECAR tyrosine kinase activity가 억제된 상태에서 rhEGF와 CGF의 반응이 유사한 패턴으로 나오는 것이 확인되어 CGF가 EGF와 마찬가지로 사람각질형성세포에서 ECAR의 ligand로 작용할 것이라는 가정을 뒷받침해 주었으며, ligand-receptor 반응을 유발하는 CGF의 분자구조가 EGF 및 EGF family와 homology를 나타낼 가능성을 보여 주었다.

사람각질형성세포에 작용하는 EGF는 진피의 섬유모세포에서 생성되어 표피로 분비되며, 기저층 (basal layer)의 각질형성세포에서 EGF가 EGFR에 작용하면 transforming growth factor-α (이하 TGF-α), amphiregulin (이하 AR), heparin binding-EGF (이하 HB-EGF), epiregulin과 같은 EGF-like growth factor의 mRNA expression을 증가시켜 각질형성세포로부터 이러한 factors들의 분비가 촉진되고, EGF를 포함한 EGF-like growth factors들은 다시 각질형성세포 EGFR에 autocrine 및 juxtacrine mode를 통해 작용하여 G<sub>1</sub> phase의 각질형성세포를 S phase로 들어가게 함으로써 각질형성세포의 증식을 촉진시킨다<sup>1,21</sup>. 뿐만 아니라 G<sub>1</sub>/S progression 동안 EGF와 EGFR의 발현이 증가하여 그 반응은 더욱 촉진되게 된다<sup>33,34</sup>.

따라서 본 실험에서 CGF가 EGF와 유사한 패턴의 반응성을 보인 것은 CGF도 EGF처럼 각질형성세포의 autocrine, juxtacrine growth factor인 TGF-α, AR, HB-EGF, epiregulin의 induction을 유도함으로써 각질형성세포의 대사 및 증식에 영향을 미칠 가능성이 있음을 시사한다.

## 참 고 문 헌

- 1) Brown GL, Curtsinger L 3rd, Brightwell JR, Ackerman DM, Tobin GR, Polk HC Jr, George-Nascimento C, Valenzuela P and Schultz GS (1986): Enhancement of epidermal regulation by biosynthetic epidermal growth factor. *J Exp Med*, **163(5)**: 1319-1324.
- 2) Enrique P (1994): Handbook of growth factor. CRC Press, Boston.
- 3) Frank H (2000): Cytosensor<sup>®</sup> Microphysiometer: technology and recent applications. *Biosen Bioelectron*, **15**: 149-158.
- 4) Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, Ambroso LA, Nelson JM, Leopold WR, Connors RW and Bridges AJ (1994): A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science*, **256**: 1093-1095.
- 5) Giampiero G, Theodore P and Paul RB (1993): Prolactin stimulates proliferation of cultured human keratinocyte. *J Invest Dermal*, **101**: 275-279.
- 6) Graf W and Baier W (1981): Hygienic and microbiological influences exerted on natural water biotopes by algae and the growth of water plants. 1. Communication: antibacterial properties of three water algae (*Hydrodictyon reticulatum*, *Chlorella vulgaris*, *Aphanothece nidulans*) in vitro (author's transl). *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg*, **174(5)**: 421-442.
- 7) Hasegawa T, Ito K and Ueno S (1999): Oral administration of hot water extract of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein mice. *Int J Immunopharmacol*, **21**: 311-323.
- 8) Hasegawa T, Tanaka K and Ueno K (1988): Augmentation of the resistance against *Escherichia coli* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in rats. *Int J Immunopharmacol*, **11**: 971-976.
- 9) Hasegawa T, Yoshikai Y and Okuda M (1990): Accelerated restoration of the leukocyte number and augmented resistance against *Escherichia coli* in cyclophosphamide-treated rats orally administered with a hot water extract of *Chlorella vulgaris*. *Int J Immunopharmacol*, **12**: 838-891.
- 10) Hirayama S, Uede R and Sugata K (1996): Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Free Radic Res*, **25**: 247-254.
- 11) Hiroshi U, Hirashi T and Tetsuya K (2000): Cytokines and chemokines in the epidermis. *J Dermatol Sci*, **24S(1)**: 29-38.
- 12) Graham LE and Wilcox LW (2000): Green algae III. pp 454. Teresa Ryu, "Algae", Prentice Hall International Limited, London.
- 13) Ifor RW and Thomas SK (1996): Immunity at the surface: homeostatic mechanism of the skin immune system. *Life Sci*, **58(18)**: 1485-1507.
- 14) Kellova G, Sturdik E and Stibranyi L (1984): Antimicrobial effects of esters and amides of 3-(5-nitro-2-furyl)acrylic acid. *Folia Microbiol (Praha)*, **29(1)**: 23-34.
- 15) Hashimoto K (2000): Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Dermatol Sci*, **24**: 46-50.
- 16) Konish F, Tanaka K and Kumamoto S (1990): Enhanced resistance against *Escherichia coli* infection by subcutaneous administration of the hot water, extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide treated mice. *Cancer Immunol Immunother*, **32**: 1-7.
- 17) Kuniaki T, Akira Y and Niyoshi N (1998): A novel glycoprotein obtained from *Chlorella vulgaris* strain CK 22 shows antimetastatic immunopotential. *Cancer Immuno Immunother*, **45**: 313-320.
- 18) Manfred Kohlhase and Peter Pohl (1987): Saturated and unsaturated sterols of nitrogen fixing blue-green algae (cyanobacteria). *Phytochem*, **27**: 1735-1740.
- 19) Margarita M, Nerea M and Lsabel R (1999): EGFR family-mediated signal transduction in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Exp Cell Res*, **252(2)**: 432-438.
- 20) Marjana TC, Mayumi K and Irwin M (1988): Epidermal signal transduction factor activation in activated keratinocyte. *J Dermatol Sci*, **17**: 167-181.
- 21) Mark V Dahl (1996): Clinical immunodermatology Mosby.
- 22) Matusiak K, Jaroszynska T and Krzywicka A (1965): Activity of antibacterial substance in *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidsa* at various stage of their development cycle and the influence of light on the process. *Bull Acad Pol Sci Biol*, **13(11)**: 667-671.
- 23) McConnell HM, Owicki JC, Parce JW, Miller DL, Baxter GT, Wad HG and Pitchford S (1992): The cytosensor microphysiometer: biological application of silicon technology. *Science*, **257**: 1906-1912.
- 24) Egeblad M, Mortensen OH, van Kempen LC and Jaattela M (2001): BIBX1382BS, but not AG1478 or PD153035, inhibits the ErbB kinase at different concentrations in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**: 25-31.
- 25) Miranda MS, Sato S and Mancini-Filho J (2001): Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* cultured on special conditions. *Boll Chin Farm*, **140(3)**: 165-168.
- 26) Monique B, John M and Kim YM (1997): Activation and

- inhibits growth of cancer: PD153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner. *Clini Can Res*, **Nov(3)**: 2099-2106.
- 27) Morita K, Matsueda T, Lida T and Hasegawa T (1999): *Chlorella* accelerates dioxin excretion in rats. *J Nutr*, **129**: 1731-1736.
- 28) Morita K, Ogata M and Hasegawa T (2000): Chlorophyll derived from *Chlorella* inhibits dioxin absorption from the gastrointestinal tract and accelerates dioxin excretion in rats. *Environ Heath Perspect*, **109(3)**: 289-294.
- 29) Neil TS and Gregory SS (1993): Growth factor and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptor. *Am J Surg*, **165**: 728-737.
- 30) Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markha A and Fusenig NE (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, **106**: 761-771.
- 31) Rehman A and Shakoori AR (2001): Heavy metal resistance *Chlorella* spp. isolated from tannery effluents and the role in remediation of hexavalent chromium in industrial waste. *Bull Environ Contam Toxicol*, **66(4)**: 542-547.
- 32) Hawkins RL and Nakamura M (1999): Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Curr Microbiol*, **38(6)**: 335-341.
- 33) Robert G (1998): Regulation of keratinocyte proliferation. *Gen Pharmac*, **30(5)**: 619-622.
- 34) Son YS, Choi SS and Kang HK (1998): Effect of Aloe component on proliferation of human skin cell. *K J Invest Dermatol*, **5(2)**: 179-192.
- 35) Takashi H, Yuki K and Kenji H (1997): Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. *Immunopham*, **35**: 273-282.
- 36) Takeda T, Toshimura K and Ishikawa T (1998): Purification and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris*. *Biochem*, **80**: 295-301.
- 37) Travieso L, Canizares RO and Borja R (1999): Heavy metal removal by microalgae. *Bull Contam Toxicol*, **62(2)**: 144-151.
- 38) Zhadko SI, Polulyakh YuA, Vorobyeva TV and Baraboy VA (1994): Lipid peroxidation of plant under microgravity and its simulation. *Adv Space Res*, **14(8)**: 103-106.
-