

산국화(*Chrysanthemum boreale* Makino) 유래 Hydrosol의 피부 각질형성세포 증식 및 이주 유도 활성에 미치는 효과

김도윤·황대일·윤미소·최인호·이환명[†]

호서대학교 화장품과학과

(2016년 1월 23일 접수, 2016년 3월 11일 수정, 2016년 3월 17일 채택)

Effect of Hydrosol Extracted from *Chrysanthemum boreale* Makino Flower on Proliferation and Migration in Human Skin Keratinocyte

Do Yoon Kim, Dae Il Hwang, Mi-so Yoon, In Ho Choi, and Hwan Myung Lee[†]

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

(Received January 23, 2016; Revised March 11, 2016; Accepted March 17, 2016)

요약: 본 연구는 수증기 증류법을 이용하여 추출한 산국화 유래 hydrosol의 피부각질형성세포(HaCaTs) 증식 및 이주 유도 활성 평가를 통해 피부재생피화 및 상처치유 활성을 확인하였다. 산국화 hydrosol은 HaCaTs의 증식과 이주를 농도 의존적으로 유도하였으며, 특히 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 음성 대조군(control)에 비해 143.71 \pm 3.37%의 증식과, 139.98 \pm 5.72%의 이주 유도 활성을 나타내었다. 또한, 산국화 hydrosol은 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk 1/2)와 serine/threonine-specific protein kinase (Akt)의 인산화를 유의하게 증가시켰을 뿐만 아니라 collagen sprout out growth를 농도 의존적으로 유도하였다. 이러한 결과들을 통해서 산국화 hydrosol은 정상적인 재생피화 과정과 상처치유 등의 활성이 있음을 확인하였고, 향후 화장품 소재로서 응용가능성을 검증하였다.

Abstract: In the present study, we extracted the hydrosol from flower of *Chrysanthemum boreale* Makino (CBMF hydrosol) by steam distillation and tested the effect of the CBMF hydrosol on skin regeneration using normal human keratinocytes (HaCaTs). CBMF hydrosol induced proliferation as well as migration in HaCaTs in a dose-dependent manner. Treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CBMF hydrosol increased proliferation to 143.71 \pm 3.37% and migration to 139.98 \pm 5.72% compared with a control group. CBMF hydrosol also significantly enhanced the phosphorylations of extracellular signal-regulated kinase (Erk) 1/2 and serine/threonine-specific protein kinase (Akt) in HaCaTs. Moreover, CBMF hydrosol dose-dependently induced sprout outgrowth in HaCaTs. These results demonstrate that CBMF hydrosol has skin regeneration and wound healing activity in HaCaTs. Therefore, CBMF hydrosol could be used as a potential cosmetic material.

Keywords: *Chrysanthemum boreale* Makino, keratinocyte, proliferation, migration, skin regeneration

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

1. 서 론

각질형성세포(keratinocyte)는 피부 최외각층인 표피의 90% 이상을 구성하는 주요 세포로서, 피부의 재생피화(re-epithelialization)와 상처치유 활성화에 중요한 역할을 한다[1-3]. 화학적·물리적 자극 및 손상에 의한 피부 상처 부위에는 keratinocyte growth factor, epidermal growth factor, transforming growth factor- β , interleukin-1 등의 다양한 케모카인(chemokine)과 사이토카인(cytokine) 및 증식인자(growth factor)들이 분비되기 시작하며[4], 이러한 인자들에 의해 각질형성세포는 상처부위로 이주(migration)하기 시작하고, 동시에 세포의 증식(proliferation)이 유도된다[4-6]. 이러한 각질형성세포의 증식과 이주 활성화는 collagen, fibronectin 등 피부 구성 단백질의 합성을 촉진하여 피부 주름 및 탄력 개선과[6,7] 피부 조직의 재생피화가 유도되어 피부 재생과 상처치유, 조직의 복원 및 장벽 강화 유도 등이 이루어지며, 피부의 항노화를 유도한다[2,6-9].

산국화(*Chrysanthemum boreale* Makino, CBM)는 국화과(compositae) 식물에 속하는 다년생 초본으로, 한국과 중국을 포함한 동북아시아 일대에 자생하고 있으며, 한의학에서 폐렴, 대장염, 구내염 등의 치료를 위해 약재로 사용되어 왔다[11-15]. 산국화는 에센셜오일(essential oil), 플라보노이드(flavonoid), 폴리아세틸렌(polyacetylene) 등의 유효 성분을 포함하고 있으며[11-15], 메탄올 추출물의 항염[12], 아토피 개선[17]활성 및 에센셜오일의 항박테리아 활성[18] 등이 보고되었다. 그러나, 유기용매를 활용한 유효성분 추출은 용매에 의한 활성물질의 변질과 잔류용매에 의한 독성이 발생할 수 있다. 최근 수증기 증류법을 활용한 산국화 유래 에센셜오일이 각질형성세포의 증식을 촉진함으로써 피부재생활성을 나타낼 뿐만 아니라[13], 수용성 floral water 성분이 혈관평활근세포의 증식과 이주 억제체를 통해 항동맥경화 활성을 나타냄을 선행연구를 통해 확인하였다[14]. 그러나, 산국화 수증기 증류 성분 중 수용성 hydrosol의 피부생리활성에 관한 연구는 확인되지 않았으며, 본 연구를 통해 인체 유래 각질형성세포의 증식과 이주 등에 미치는 산국화 hydrosol의 효능을 확인함으로써 피부조직 재형성 및 상처치유 등의 소재로서 응용 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

본 실험에 사용된 recombinant human epidermal growth factor (rhEGF)는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (P/S), phosphate buffered saline (PBS)은 Hyclone (Logan, UT, USA) 또는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 구입하였다. Type I collagen은 BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였으며, bovine serum albumin (BSA), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Ez-CyTox kit은 DAEIL LAB Service (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Diff-Quick은 Baxter Healthcare Corporation (McGraw Park, IL, USA)에서 구입하였다. Anti-Akt, anti-phospho Akt, anti-Erk1/2, anti-phospho Erk1/2, anti-mouse HRP conjugate, anti-rabbit HRP conjugate는 Cell signaling (Beverly, MA, USA), anti- β -actin는 Sigma에서 구입하였다.

2.2. 시료의 추출

본 실험에서 사용한 산국화는 호서대학교 아산캠퍼스 한방화장품과학과 실습지에서 재배하여 채취하였으며, 국립수목원 양종철 연구원에 의해 동정되었다. 산국화(voucher no. CBMEO-0001)는 표본으로 제작하여 호서대학교 한방화장품과학과 피부/혈관 생물학 연구실에 보관되어있다. 산국화(20 kg)를 세척한 후, 수증기 증류장치를 이용하여 100 °C에서 2 h 동안 hydrosol (10 L)을 추출하였다. Hydrosol은 동결건조기 (Ilshin Lab, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 동결건조시켜 분말로 제조하였으며, DMSO에 녹여 실험에 사용하였다.

2.3. 세포 배양

본 실험에 사용된 사람 피부 유래 정상 각질형성세포 (human skin keratinocyte cell line; HaCaTs)은 대구 경북 한방산업진흥원에서 분양받아 사용하였다. HaCaTs은 DMEM 배지에 10% FBS와 1% P/S를 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2.4. 세포 증식능 평가

시험물질의 세포 증식능은 XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) assay를 통해 확인하였다. HaCaTs를 96-well plate (2×10^3 cells/well)에 분주한 다음, 12 h간 동안 배양하였다. 그 후, 산국화 hydrosol을 농도별(0.001 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 48 h 배양하였다. 세포의 증식능을 측정하기 위하여 well 당 10 μL 의 Ez-CyTox kit reagent를 처리하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 30 min 동안 반응시킨 후, enzyme-linked immunosorbent assay reader (Synergy 2, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 세포 이주능 평가

시험물질의 세포 이주 유도능을 평가하기 위해서 48-well microchemotaxis Boyden chambers (Neuro-Probe, Gaithersburg, Maryland, USA)를 이용하였다. Bottom chamber에 산국화 hydrosol을 농도별로 주입하고, 0.1 mg/mL type I collagen으로 코팅된 polycarbonate membrane (8 μm pores, Neuro-Probe)을 올려주었다. Upper chamber에 HaCaTs (3×10^4 cells/well)을 주입하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 3 h 동안 배양한 후, membrane을 Diff-Quick으로 고정 및 염색하여 이주된 세포를 측정하였다.

2.6. Western Blot

시험물질이 처리된 HaCaTs를 RIPA buffer (Cell signaling)를 이용하여 용해한 후, 17,000 xg에서 15 min간 원심 분리하여 단백질을 분리하였으며, DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)으로 단백질을 정량하였다. 50 ~ 100 μg 의 단백질을 10 ~ 12% polyacrylamide SDS gel에서 전기영동한 후, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 이동시켰다. PVDF membrane을 blocking buffer (3% skim milk / PBS)로 2 h 동안 blocking하고 1차 antibody를 blocking buffer에 희석하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 하였다. PBS-T (0.05% Tween 20이 포함된 PBS)로 washing 후 2차 antibody를 blocking buffer에 희석하여 실온에서 반응시켰다. PBS-T로 washing하고 ECL 용액(Welgene Inc, Daegu, Korea)에 반응시켜 단백질의 발현정도를

분석하였다.

2.7. Collagen Sprout Assay

HaCaTs (2×10^7 cells/mL)과 type I collagen, 1 N NaOH 및 10X DMEM을 혼합하여(pH 7.2) 24 well plate에 spotting한다. Collagen spot이 건조되면 시험물질을 농도별로 처리하여 72 h 동안 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. Diff-Quik을 이용하여 collagen spot을 고정 및 염색시킨 후 Scion Image software로 collagen spot의 outgrowth를 측정하였다.

2.8. Statistical Analysis

실험결과는 mean \pm S.E.M으로 표기하였으며, Graphpad Prism software (version 5.00 for Windows, San Diego, CA, USA) 프로그램을 이용한 student's *t*-test 방법을 통해 유의성 여부를 분석하였고, 그 결과 $p < 0.05$ 일 경우에 한하여 유의성을 인정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 산국화 Hydrosol의 각질형성세포 증식 유도 활성화

각질형성세포의 증식은 정상적인 각질형성층의 유지뿐만 아니라, 피부조직의 재형성과 상처치유 등의 과정에서 매우 중요한 요소[4-9]이나, 현재까지 산국화 에센셜오일을 제외한 유효물질의 각질형성세포 증식과 관련된 보고는 없다. 산국화 hydrosol은 인체유래 각질형성세포인 HaCaTs의 증식을 농도 의존적으로 (0.001 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$) 유도하는 것이 관찰되었다(Figure 1). 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 에서 음성대조군(control)에 비해 $120.31 \pm 0.74\%$, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $143.71 \pm 3.37\%$ 의 증식유도 활성을 나타내어, 각질형성세포의 growth factor로 알려진 rhEGF (50 ng/mL)를 처리한 양성대조군($130.12 \pm 4.35\%$)과 유사한 세포 증식 유도 활성을 나타내었다. 선행연구 결과의 지용성 증류 성분인 산국화 에센셜오일은 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 HaCaT의 최대 증식 유도활성($176.33 \pm 7.74\%$)을 나타내는 반면, 본 연구의 수용성 증류성분인 hydrosol은 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 최대 증식 유도활성을 나타내는 것으로 확인되었다[13]. 이러한 활성의 차이는 산국화 에센셜오일이 작은 분자량의 지용성 물질로 구성되어, 세포막 투과성 및 세포 내로 이동이 용이한 반면, 친수성의 hydrosol 성분은 세포막

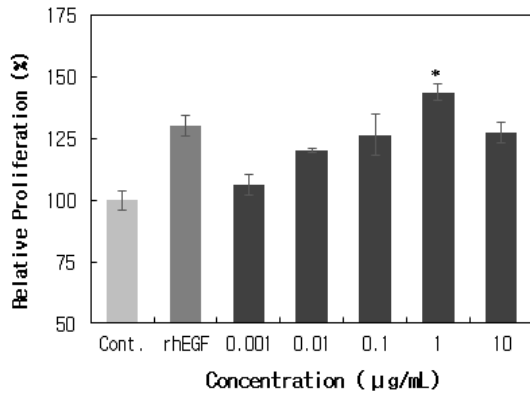


Figure 1. Effect of CBMF hydrosol on proliferation in HaCaTs. The HaCaTs were treated with in the presence or absence of CBMF hydrosol (0.001 ~ 10 µg/mL) for 48 h and then subject to XTT assay. Cell proliferation in the quiescent state was considered as 100% (n = 8). Each value represents the mean ± S.E.M. rhEGF (50 ng/mL) response in each assay was used as a positive control. * $p < 0.05$ compared with the quiescent state. Cont, Control; rhEGF, recombinant human epidermal growth factor; CBMF hydrosol, hydrosol from *Chrysanthemum boreale* Makino flower.

투과성이 낮음으로서 활성의 차이를 나타내는 것으로 분석된다.

3.2. 산국화 Hydrosol의 각질형성세포 이주 유도 활성

각질형성세포의 이주는 피부재생 및 상처치유를 포함한 조직 재형성 과정에서 필수적인 단계이며[4-9], 산국화 hydrosol은 농도 의존적으로(0.001 ~ 10 µg/mL) HaCaTs의 이주를 유도하는 것이 관찰되었다(Figure 2). 0.1 µg/mL에서 음성대조군에 비해 121.41 ± 4.08%, 1 µg/mL에서 139.98 ± 5.72%의 이주 유도 활성을 나타내었다. 각질형성세포의 증식과 이주 활성의 증가는 피부조직 재형성 과정 중 type I, IV collagen 등의 피부 구성 단백질 합성을 촉진하며, 피부 탄력 및 장벽 강화 등을 유도하는 것으로 알려졌으며[6,7], 향후 산국화 hydrosol 및 구성성분의 피부 구성 단백질 합성에 대한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

3.3. 산국화 Hydrosol의 각질형성세포 내 신호전달체계에 미치는 영향

산국화 hydrosol의 각질형성세포 증식 및 이주 유도 활성과 관련된 signaling pathway를 확인하기 위하여,

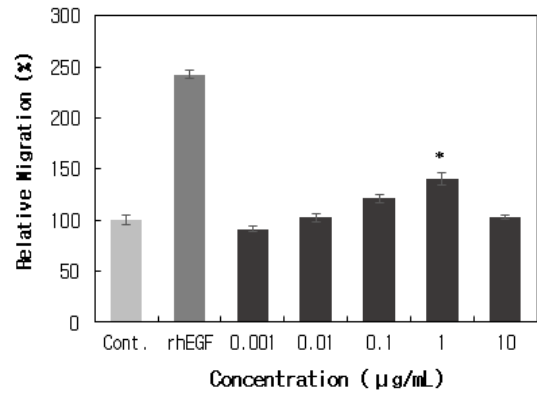


Figure 2. Effect of CBMF hydrosol on migration in HaCaTs. The HaCaTs were treated with in the presence or absence of CBMF hydrosol (0.001 ~ 10 µg/mL) for 3 h. Migration was quantified using a Boyden chamber assay. Cell migration in the quiescent state was expressed as 100% (n = 8). Each value represents the mean ± S.E.M. rhEGF (5 ng/mL) response in each assay was used as a positive control. * $p < 0.05$ compared with the quiescent state. Cont, Control; rhEGF, recombinant human epidermal growth factor; CBMF hydrosol, hydrosol from *Chrysanthemum boreale* Makino flower.

각 단계별 antibody를 활용한 Western blot을 통해 확인하였다. 산국화 hydrosol은 HaCaT 내 Erk 1/2와 Akt의 인산화를 농도 의존적으로(0.001 ~ 10 µg/mL) 활성화하는 것으로 확인되었다(Figure 3). Erk 1/2의 인산화는 1 µg/mL에서 음성대조군에 비해 205.45 ± 8.90%, 10 µg/mL에서 228.31 ± 5.89%의 인산화 증가 시켰다(Figure 3A, B). Akt의 인산화는 1 µg/mL에서 음성대조군에 비해 196.78 ± 8.88%, 10 µg/mL에서 236.58 ± 10.96%의 인산화를 유도함이 관찰되었다(Figure 3A, C). Erk 1/2와 Akt pathway는 피부 각질형성세포의 증식과 이주를 조절하는 대표적인 신호전달체계로 알려져 있으며[9,13,16], 본 연구를 통해 산국화 hydrosol은 HaCaT의 Erk 1/2와 Akt의 인산화를 조절하여 세포의 증식과 이주 활성에 관여하는 것으로 확인되었다.

3.4. 산국화 Hydrosol이 HaCaT Collagen Sprout Out Growth에 미치는 영향

3차원적인 세포의 증식과 이주능을 평가하기 위해 collagen sprout assay[16]를 활용하였으며, 산국화 hydrosol은 collagen HaCaT spot의 outgrowth를 농도 의존적으로(0.01 ~ 10 µg/mL) 유도하였다(Figure 4).

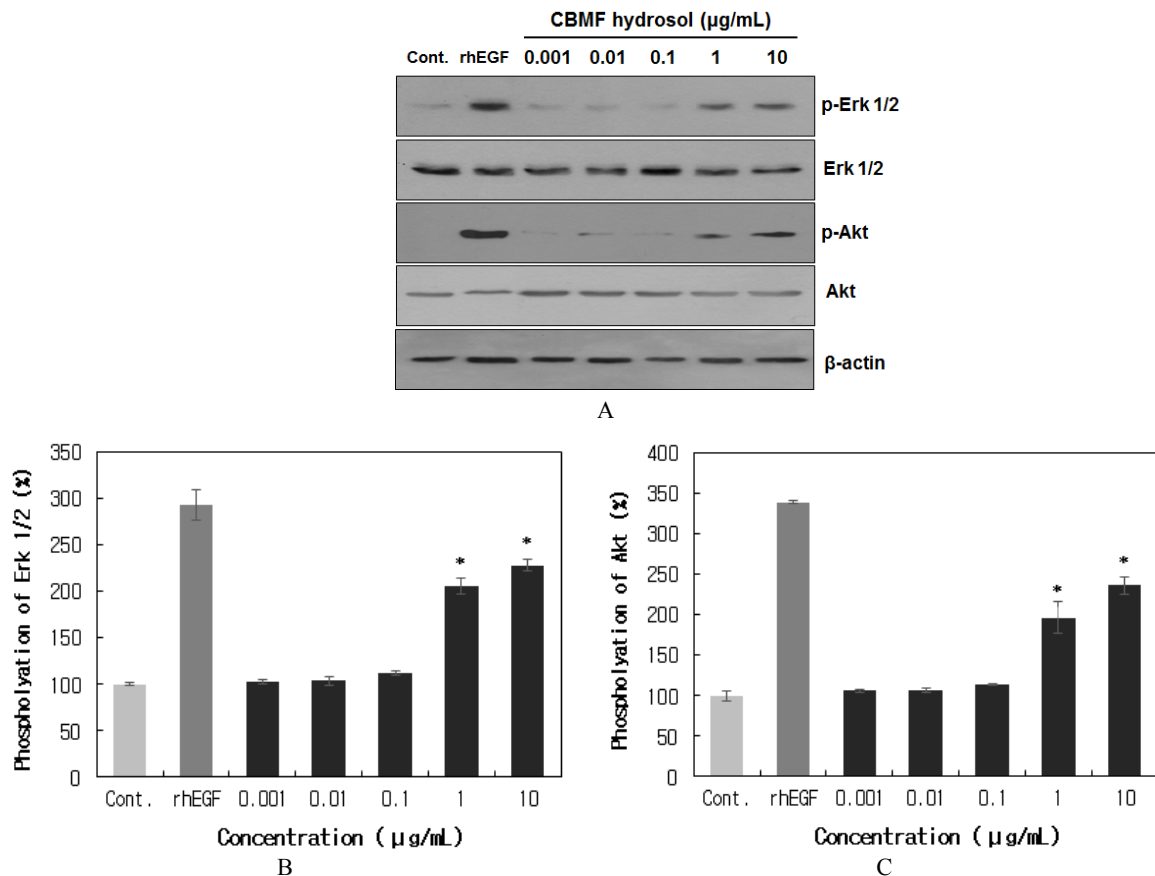


Figure 3. Effect of CBMF hydrosol on phosphorylation of Erk 1/2 and Akt in HaCaT. (A) HaCaTs were treated without or with CBMF hydrosol (0.001 ~ 10 µg/mL) for 10 min. The cell lysates were western blotted with each antibody (n = 3). The phosphorylation of Erk 1/2 and Akt were examined with phospho-specific antibodies. The total expressions of kinases and β-actin were measured with nonphospho-specific and anti-β-actin antibody, respectively. rhEGF response was used as a positive control. (B), (C). The statistical results of Erk 1/2 (B) and Akt phosphorylation (C) obtained from panel (A). rhEGF (50 ng/mL) response was used as a positive control. Each value represents the mean ± S.E.M. Each phosphorylation in the quiescent state is considered as 100%. *p < 0.05 compared with the quiescent state. Cont, Control; rhEGF, recombinant human epidermal growth factor; CBMF hydrosol, hydrosol from *Chrysanthemum boreale* Makino flower; p-Erk1/2, phosphorylated Erk1/2; p-Akt, phosphorylated Akt.

0.1 µg/mL에서 음성대조군에 비해 152.25 ± 9.43%, 1 µg/mL에서 373.88 ± 28.33%의 outgrowth를 유도하였으며, rhEGF (50 ng/mL)를 처리한 양성대조군(389.41 ± 6.01%)과 유사한 활성을 나타내었다. 본 연구에서 양성대조군으로 사용된 rhEGF 등의 피부 각질형성세포 성장인자(growth factors)는 단백질 구성되어, 단백질 분해효소 및 열 등으로부터 불안정하지만, 산국화 hydrosol은 천연물로부터 분리된 polyphenolic 성분으로 구성되어 있어 상대적 안정성이 높을 것으로 사료된다[14]. 또한 hydrosol은 수증기 증류법을 활용하여 분리함으로써 유기용매를 활용한 추출물에 비해 유효성

분의 변질 및 잔류 용매에 의한 독성이 낮을 것으로 생각된다. 향후, 선행연구를 통해 확인된 산국화 hydrosol의 분석결과를 바탕으로[14] 산국화 hydrosol의 구성 단일성분의 피부재생 및 상처치유 활성 연구가 필요할 것으로 사료된다.

4. 결 론

수증기 증류법을 통해 추출한 산국화 hydrosol은 유기용매 추출법에 비해 경제적이며, 추출 소요시간 및 공정이 짧아 유효성분의 변질 및 잔류 용매에 대한

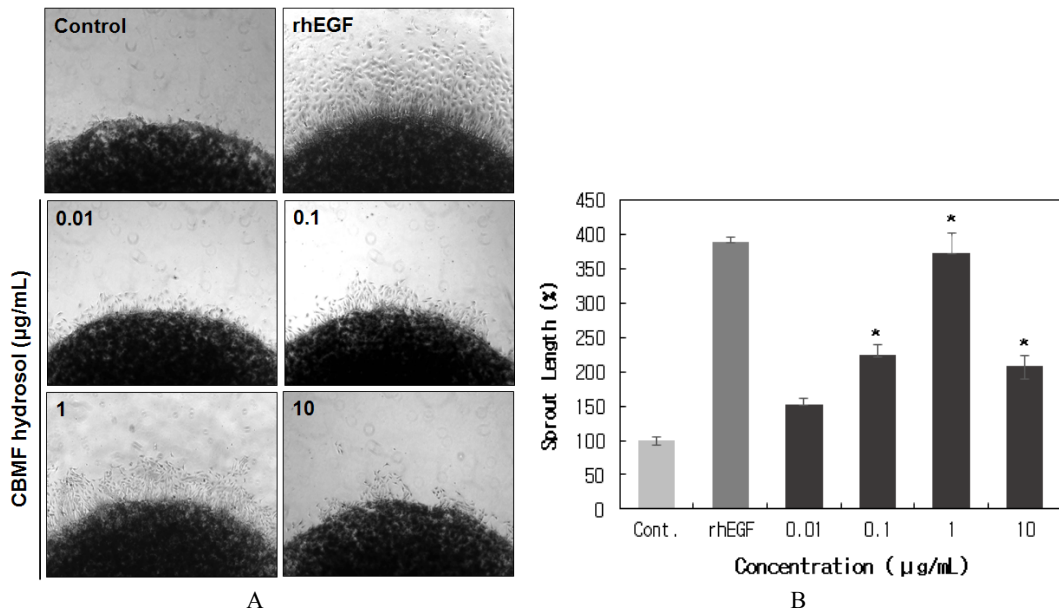


Figure 4. Effect of CBMF hydrosol, on the sprout formation of HaCaT. (A) Cells were mixed with collagen mixture and then dropped on a 24-well plate. Spots were treated without or with CBMF hydrosol (0.01 ~ 10 µg/mL) for 72 h. Spots and sprout out growth cells were stained with Diff-Quick solution and then images were obtained using microscopy. (B) The statistical results obtained from panel (A). The level in the quiescent state (Control) is expressed as 100% (n = 8). rhEGF (50 ng/mL) response was used as a positive control. Each value represents the mean ± S.E.M. *Denotes a significant difference from control group, with $p < 0.05$. Cont, Control; rhEGF, recombinant human epidermal growth factor; CBMF hydrosol, hydrosol from *Chrysanthemum boreale* Makino flower.

독성이 낮을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 수증기 증류법을 이용하여, 분리된 산국화 hydrosol의 피부 각질형성세포의 증식과 이주에 미치는 영향을 확인하였다.

산국화 hydrosol은 인체유래 각질형성세포인 HaCaTs의 증식과 이주를 농도의존적으로 유도하였으며, 이러한 활성은 Erk 1/2와 Akt signaling pathway를 통해 매개됨이 관찰되었다. 본 연구 결과를 통해 산국화 hydrosol은 각질형성세포의 증식과 이주 유도함으로서 피부 재생과 상처치유 활성을 내포하고 있음을 확인하였고, 향후 화장품, 식품 및 의약품 분야에서 피부재생 및 상처치유 개선 소재로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgment

본 연구는 2015년도 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 중소기업공동연구실 지원 사업으로 수행

된 연구결과입니다(과제번호: N0001657).

Reference

1. 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).
2. 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).
3. J. L. García, A. Asadinezhad, J. í. Pacherník, M. Lehocký, I. Junkar, P. Humpolíček, P. Sába, and P. Valášek, Cell proliferation of HaCaT keratinocytes on collagen films modified by argon plasma treatment,

- Molecules*, **15**(4), 2845 (2010).
- M. M. Santoro and G. Gaudino, Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing, *Exp. Cell Res.*, **304**(1), 274 (2005).
 - 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).
 - E. A. O'Toole, Extracellular matrix and keratinocyte migration, *Clin. Exp. Dermatol.*, **26**(6), 525 (2001).
 - G. S. Schultz and A. Wysocki, Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing, *Wound Repair Regen.*, **17**(2), 153 (2009).
 - 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).
 - 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).
 - M. Lorencini, C. A. Brohem, G. C. Dieamant, N. I. T. Zanchin, and H. I. Maibach, Active ingredients against human epidermal aging, *Ageing Res. Rev.*, **15**, 100 (2014).
 - K. J. Kim, Y. H. Kim, H. H. Yu, S. I. Jeong, J. D. Cha, B. S. Kil, and Y.-O. You, Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreale*, *Planta Med.*, **69**(3), 274 (2003).
 - Y. H. Kim, J. H. Sung, M. S. Sung, Y. M. Choi, H.-S. Jeong, and J. S. Lee, Involvement of heme oxygenase-1 in the anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum boreale* Makino extracts on the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages, *J. Ethnopharmacol.*, **131**(3), 550 (2010).
 - 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).
 - 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).
 - J. R. Lee, M. S. Yang, J. Lee, S. W. Hwang, Y. H. Kho, and K. H. Park, New guaianolides from leaves and stems of *Chrysanthemum boreale*, *Planta Med.*, **69**(9), 880 (2003).
 - 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).
 - G. Yang, K. Lee, D. G. An, M. H. Lee, I. H. Ham, and H. Y. Choi, Effect of *Chrysanthemi borealis* flos on atopic dermatitis induced by 1-chloro 2,4-dinitrobenzene in NC/Nga mouse, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **34**(3), 413 (2012).
 - B. S. Kim, S. J. Park, M. K. Kim, Y. H. Kim, S. B. Lee, K. H. Lee, N. Y. Choi, Y. R. Lee, Y. E. Lee, and Y. O. You, Inhibitory effects of *Chrysanthemum boreale* essential oil on biofilm formation and virulence factor expression of *Streptococcus mutans*, *Evid.-based Complement Altern. Med. Epub.*, **2015**, 11 (2015).