

각질형성세포에서 Chrysin이 Vitamin D Receptor의 전사 활성화에 미치는 영향

추 정 하[†] · 이 상 화

(주) LG생활건강 기술연구원
(2012년 6월 18일 접수, 2013년 2월 4일 수정, 2013년 3월 13일 채택)

The Effect of Chrysin on the Transcriptional Activity of Vitamin D Receptor in Human Keratinocytes

Jung Ha Choo[†] and Sang Hwa Lee

R&D Center, LG Household & Healthcare, Ltd.
84 Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea
(Received June 18, 2012; Revised February 4, 2013; Accepted March 13, 2013)

요 약: Chrysin (5,7-dihydroxyflavone)은 프로폴리스, 꿀 같은 음식과 다양한 식물에 존재하는 천연 플라보노이드이다. Chrysin은 항산화, 항노화, 항염, 항암 효과 등 다양한 생물학적 효과를 가진다고 알려져 있다. 이 연구에서, 우리는 사람의 각질형성세포에서 chrysin이 VDR을 통한 transcriptional activity에 미치는 영향을 dual-luciferase assay을 통하여 살펴보았다. Chrysin은 농도 의존적으로 VDR을 통한 transcriptional activity를 증가시켰다. Quantitative real time PCR을 통해 chrysin이 사람의 각질형성세포에서 VDR mRNA의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 또한, chrysin이 각질형성세포의 분화 마커인 keratin 10, involucrin 그리고 filaggrin의 mRNA 발현을 증가시킴을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 chrysin이 VDR을 통한 transcriptional activity를 조절하여 각질형성세포의 분화를 촉진시킬 수 있다는 것을 시사한다.

Abstract: Chrysin (5,7-dihydroxyflavone) is a natural flavonoid found in various plants and foods such as propolis and honey. It has been reported that chrysin has various biological effects including antioxidant, anti-aging, anti-inflammatory and anti-cancer. In this study, we investigated the effect of chrysin on the transcriptional activity of VDR in human epidermal keratinocytes by performing dual-luciferase assay. Chrysin significantly induced the transcriptional activity of VDR in a concentration-dependent manner. The VDR mRNA expression was investigated by quantitative real time PCR and chrysin increased the VDR mRNA expression in normal human epidermal keratinocytes. We also found that chrysin increased the expression of keratinocyte differentiation markers such as keratin 10, involucrin and filaggrin. Therefore, the results suggest that chrysin can stimulate the differentiation of human keratinocytes by increasing transcriptional activity of VDR.

Keywords: chrysin, vitamin D, transcriptional activity, VDR, keratinocyte differentiation

1. 서 론

플라보노이드(flavonoids)는 페닐기 2개가 피란고리

혹은 그와 유사한 구조의 탄소원자 3개를 매개로 결합하고 있는 물질군의 총칭이다. 플라보노이드는 모든 식물에 존재하는 저분자량의 폴리페놀(polyphenol)화합물로서 플라보놀(flavonols), 플라본(flavones), 안토시아닌(anthocyanidins), 이소플라본(isoflavones) 그리고

[†] 주 저자 (e-mail: jhchoo@lgcare.com)

네오플라보노이드(neoflavonoids) 등의 하위 그룹을 포함하는 색소성분이다. 플라보노이드는 과일, 채소를 비롯하여 차, 와인 등의 음료에 많이 존재하여 사람의 음식에 필수적으로 함유되는 성분으로 하루에 500 ~ 1000 mg 정도의 양을 섭취하게 된다[1]. 플라보노이드는 항산화 효과, 염증 억제, 항암 효과, 심혈관계 질환 예방 등의 다양한 생물학적 효과를 가진다[2-5].

Chrysin (5,7-dihydroxyflavone)은 프로폴리스, 꿀 같은 음식과 다양한 식물에 존재하는 천연 플라보노이드로 [6], 화학적 구조는 Figure 1에 나타내었다. Chrysin도 항산화, 항노화, 항염, 항암 효과 등 다양한 생물학적 효능을 가진다고 알려져 있다[7-10]. 최근 연구에 따르면 chrysin은 자외선 UVA와 UVB에 의한 손상으로부터 각질형성세포를 보호한다고 보고되었다[12].

Vitamin D는 대부분 피부에서 합성되는데, 자외선을 받으면 피부의 각질형성세포에 있는 7-dehydrocholesterol (7-DHC)가 vitamin D₃로 전환된다[13]. 이 vitamin D₃는 프로호르몬(prohormone)으로 바로 사용되는 것이 아니라 대사과정을 거쳐 활성형 vitamin D인 1,25(OH)₂D로 전환된다. 피부는 vitamin D의 합성 및 1,25(OH)₂D로의 대사과정이 모두 일어날 수 있는 신체의 유일한 기관이다[14-18]. 피부에서 생성되는 1,25(OH)₂D는 세포 증식 억제, 세포 분화 촉진, 면역 조절 등에 관여하는 것으로 알려져 있다[19-21].

Vitamin D가 세포에 작용하는 조절 기작은 2가지가 있다. 먼저, vitamin D가 vitamin D receptor (VDR)에 결합하여 작용하는 것이다. VDR은 각질세포를 비롯한 여러 세포에서 발현된다. Vitamin D와 VDR의 결합체가 세포 내 핵으로 들어가 vitamin D response elements (VDRE)라 불리는 특정 DNA 염기서열에 결합하여 전사 인자(transcription factor)로 작용하여 표적 유전자(target genes)의 발현을 변화시키는 것이다. 이는 주로 세포 증식에 영향을 주는 유전자의 전사를 일으킨다[22-25]. 또 다른 하나는 세포 내의 칼슘 이온이 유입되게 하여 작용하는 것이다[26,27]. Vitamin D는 세포 내의 칼슘 이온의 농도를 증가시키는 일련의 과정에 작용하여, 각질형성세포의 분화를 촉진시킨다[23]. 이런 두 가지 기작의 조합이 표적 세포의 증식을 억제하고, 분화를 촉진하게 만든다.

Chrysin은 항산화, 항노화, 항염, 항암 등의 효능에 대해 많은 연구가 진행되고 있으나, 피부 각질형성세

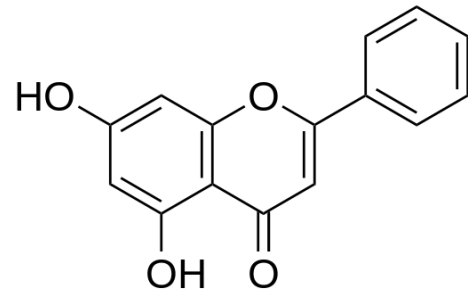


Figure 1. The chemical structure of chrysin.

포에서 chrysin의 작용 기전에 대한 연구는 미미하다. 본 연구에서는 피부 각질형성세포에서 chrysin이 VDR을 통한 전사 활성화(transcriptional activity)에 미치는 영향과 VDR mRNA의 발현 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, chrysin이 각질형성세포 분화 마커(marker)인 keratin 10, involucrin 그리고 filaggrin의 발현을 증가시키는 것을 확인하였고, 이는 chrysin이 각질형성세포의 분화를 촉진시킬 수 있음을 시사한다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 시약 및 기기

Chrysin (분자량 254.24, Xian natural field biotechnique Co. Ltd., China)은 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA)에 20 mg/mL로 녹여 stock solution으로 보관하였다. 1,25(OH)₂D (Sigma, USA)는 에탄올(Merck, Germany)에 녹여 사용하였다.

2.2. 세포 배양

자발적으로 불멸화가 유도된 사람의 각질형성세포 주인 HaCaT 세포[28]는 5% charcoal stripped fetal bovine serum (CS-FBS; Sigma, USA), penicillin 50 U/mL, streptomycin 50 µg/mL가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, USA) 배지를 사용하여 5%의 CO₂, 37 °C에서 배양하였다.

사람의 정상 표피 각질형성세포(normal human epidermal keratinocytes)는 ATCC (USA)에서 구입하였다. Dermal basal cell media (DBCM; ATCC, USA)를 사용하였고, keratinocyte growth factor (KGF; ATCC, USA)를 넣어서 사용하였다. 이때 calcium의 농도는 0.06 mM이었다. 각질형성세포 분화를 위해서 4×10^5 개의 밀

도로 세포를 60 mm 배양접시에 깔고, 48 h 동안 배양한 뒤 KGF가 들어있는 DBCM에 calcium의 농도를 1.5 mM 로 맞춰 3 d 동안 5% CO₂, 37 °C에서 배양하였다. 1 × 10⁻⁷ M 농도의 1,25(OH)₂D 또는 2 µg/mL chrysin 처리도 calcium의 농도가 0.06 mM인 DBCM에 첨가하여 사용하였다.

2.3. Dual-luciferase Reporter Assay

HaCaT 각질형성세포를 70% confluent하게 키운 후, VDRE reporter (Qiagen, Germany) 1 µg을 lipofectaminTM reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 transfection 하였다. VDRE reporter는 VDR에 의해 firefly luciferase가 발현할 수 있도록 만들어진 plasmids와 항상 *Renilla* luciferase를 발현하는 plasmids가 40 : 1의 비율로 들어있는 DNA 혼합물이다. 이 transfection된 세포들을 24 h 배양 후 serum이 없는 DMEM 배지에 chrysin을 농도별로 첨가하여 24 h 동안 배양하였다.

Luciferase activity를 측정하기 위해 dual-luciferase[®] reporter assay (Promega, USA)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 실험하였다. 간략히 설명하자면, 세포 배양액을 제거하고, phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 세포를 한 번 씻어내고, lysis buffer를 이용하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해액에 firefly luciferase의 기질인 LARII를 넣고 luminometer Victor³ (PerkinElmer, USA)로 측정하였다. 그 후 *Renilla* luciferase의 기질인 Stop & Glo[®] reagent를 넣고 *Renilla* luciferase activity를 측정하였다. *Renilla* luciferase activity를 internal control로 사용하여 음성 대조군의 firefly luciferase activity를 기준으로 수치화하여 계산하였다.

2.4. Quantitative Real Time PCR

각질형성세포에서 RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, 정량하여 1 µg의 RNA를 GeneAmp[®] RNA PCR kit (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 역전사(reverse transcription)하였다. 역전사 반응은 Mycycler[®] PCR 기기(Biorad, USA)를 이용하여 수행하였다.

합성된 cDNA는 한 반응 당 300 ng을 사용하였고, iTaqTM Fast SYBR Green Supermix With ROX (Biorad, USA)와 유전자 특이적인 프라이머를 사용하여 quantitative real

time PCR을 수행하였다. Real time PCR은 CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System 기기(Biorad, USA)를 이용하여 수행하였다. Quantitative real time PCR에 사용된 프라이머는 다음과 같다. VDR (VDR-L: 5'-CCA GTT CGT GTG AAT GAT GG-3', VDR-R: 5'-AGA TTG GAG AAG CTG GAC GA-3'); involucrin (IVL-L: 5'-GAA CAG CAG CAA AAG CAC CT-3', IVL-R: 5'-CAA ACA CAG GCT GCT CCA-3'); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; GAPDH-L: 5'-GGC TCT CCA GAA CAT CAT CC-3', GAPDH-R: 5'-TTC TAG ACG GCA GGT CAG GT-3'). 모든 프라이머는 필코리아(Korea)에서 주문 제작하였다. Real time PCR을 통해 얻은 실험 결과는 housekeeping 유전자인 GAPDH를 기준으로 $\Delta\Delta Ct$ 방법으로 계산하여 나타내었다.

2.5. 통계적 분석

실험 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었고, Student's *t*-test법을 이용하여 *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. VDR을 통한 Transcriptional Activity 증진 효과

VDR은 vitamin D와 결합하면, 핵 내로 이동한 후 표적 유전자의 VDRE를 인식하고 그것에 결합하여 transcription factor로 작용한다. 우리는 vitamin D와 같이 VDR에 작용할 수 있는 물질을 찾기 위해 단일물 라이브러리를 이용하여 스크리닝(screening)을 실시하였고, chrysin을 후보 물질로 찾았다. Chrysin이 VDR을 통한 transcriptional activity에 미치는 영향을 dual-luciferase reporter assay를 수행하여 알아보았다. VDRE 뒤에 firefly luciferase를 발현할 수 있게 만들어진 plasmids와 internal control로 *Renilla* luciferase를 항상 발현하는 plasmids를 동시에 HaCaT 각질형성세포에 transfection 하였다. Transfection된 HaCaT 각질형성세포를 24 h 동안 배양한 후, 0.02, 0.2, 2 µg/mL 농도의 chrysin을 24 h 동안 처리한 뒤 luciferase activity를 측정하였다. 또한, 양성 대조군으로 활성형 vitamin D인 1,25(OH)₂D를 5 × 10⁻⁸ M로 24 h 동안 처리한 뒤 luciferase activity를 측정하였다. 이때, chrysin과 1,25(OH)₂D의 처리 농도는 HaCaT 각질형성 세포에서 24 h 동안 처리한 뒤 MTT assay를 실시하여

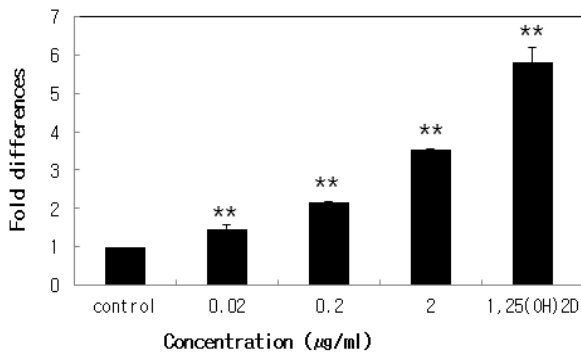


Figure 2. Effect of chrysin on transcriptional activity of VDR. HaCaT cells were transfected with plasmids containing vitamin D response elements in front of the firefly luciferase reporter gene and concomitant with *Renilla* luciferase expression vectors and then treated with various concentration of chrysin or 5×10^{-8} M of 1,25(OH)₂D. After 24 h incubation, cells were analyzed for luciferase activity (** $p < 0.01$).

세포 생존에 영향을 주지 않는 농도임을 확인하였다(data not shown). Figure 2에서 보는 바와 같이, 음성 대조군 대비 chrysin을 처리한 실험군에서 농도가 증가함에 따라 luciferase activity가 유의미하게 증가하였다. Chrysin을 0.02, 0.2, 2 µg/mL을 처리했을 때, 각각 1.5배, 2.2배, 3.5배만큼 VDR이 작용하는 promoter의 transcriptional activity가 증가하였다. 이로써 chrysin이 vitamin D의 작용 기전인 VDR을 통한 전사를 활성화시킬 수 있다는 것을 알 수 있다. 1,25(OH)₂D를 처리한 양성 대조군에서 VDR의 transcriptional activity는 음성 대조군 대비 5.8배 증가하여, chrysin은 vitamin D만큼 VDR의 transcriptional activity를 증가시키진 못했다. 이는 VDR이 vitamin D에 특이적(specific)이고 민감(sensitive)하기 때문이라 여겨진다. Chrysin이 vitamin D만큼 VDR의 transcriptional activity를 증가시키지 못하더라도 VDR을 통한 transcriptional activity를 증가시키는 것은 우리의 실험 결과를 통해 알 수 있었다. 이는 chrysin이 vitamin D가 VDR를 통해 세포에 작용하는 것과 비슷하게 작용할 수도 있음을 시사한다.

3.2. VDR의 발현 증가 효과

우리는 chrysin을 사람의 정상 표피 각질형성세포에 처리했을 때, VDR의 발현에는 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. Chrysin의 처리 농도는 Figure 2의 결과에서

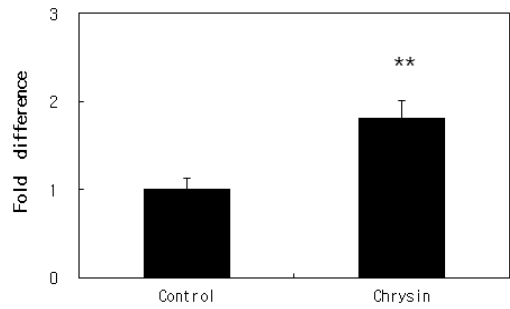


Figure 3. Effect of chrysin on mRNA expression of VDR. Normal human epidermal keratinocytes were treated with 2 µg/mL of chrysin for 48 h. Total RNA was extracted and subjected to real time PCR analysis with GAPDH used as a housekeeping gene. The mRNA expression level of VDR in the control was designated as 1.0. Results are the means \pm S. D. of three samples (** $p < 0.01$).

VDR의 transcriptional activity를 가장 많이 증가시킨 2 µg/mL 농도로 정했고, 이 농도의 chrysin을 각질형성 세포에서 48 h 동안 처리한 뒤 MTT assay를 실시하여 세포 생존에 영향을 주지 않는 농도임을 확인하였다(data not shown). 2 µg/mL 농도의 chrysin을 각질형성 세포에 48 h 동안 처리 후 RNA를 추출하고 cDNA를 만들어 이를 template로 사용하여 quantitative real time PCR을 실시하였으며, $\Delta\Delta Ct$ 법을 이용하여 VDR mRNA 발현 변화량을 계산하였다. 또한, 음성 대조군의 VDR mRNA 발현량을 1.0으로 기준하여 chrysin 처리 실험군의 VDR mRNA 발현량을 수치화하여 나타내었다. Figure 3에서 보는 바와 같이, 음성 대조군 대비 chrysin을 처리한 실험군에서 VDR mRNA의 발현이 1.8배 증가한 것을 알 수 있다. 이 결과는 chrysin이 각질형성세포에서 VDR의 발현을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 이는 chrysin이 VDR을 통해 작용하기 위해서 VDR이 많이 필요하기 때문에 VDR의 발현이 증가하는 것으로 해석할 수 있다. M. Seifert 등의 논문에 따르면, 활성형 vitamin D인 1,25(OH)₂D를 각질형성세포에 처리하였을 때 VDR의 발현이 증가한다고 한다[29]. 우리의 실험 결과에서 chrysin을 각질형성세포에 처리하였을 때 VDR의 발현이 증가하였다. 이는 chrysin이 VDR을 통한 transcriptional activity를 증가시키는 이전의 결과와 함께, chrysin이 각질형성세포에서 VDR를 통한 기전으로 vitamin D와 유사하게 작용할 수 있는 가능성을 보여준다.

3.3. Chrysin에 의한 각질형성세포의 분화 마커 발현

사람의 표피에서 calcium의 농도는 각질형성세포의 분화에 중요한 인자이다. *In vitro* 배양에서도 각질형성세포의 분화를 유도하기 위해 calcium의 농도를 조절한다. 각질형성세포를 배양할 때, 배양액의 calcium 농도가 0.05 ~ 0.1 mM로 낮은 경우 각질형성세포는 빨리 증식하고, 분화하지 않는다. 그러나 calcium 농도가 1.2 mM 이상일 경우 각질형성세포는 분화하게 된다[30].

우리는 각질형성세포에서 chrysin이 각질형성세포의 분화를 촉진하는지 알아보기 위해 분화 마커인 keratin 10, involucrin 그리고 filaggrin의 mRNA 발현량을 살펴 보았다. 각질형성세포에 2 µg/mL 농도의 chrysin을 3 d 동안 처리하고, 각질형성세포의 분화 마커의 mRNA 발현 변화를 quantitative real time PCR을 실시하여 살펴 보았다. 1.5 mM calcium을 처리한 실험군을 양성 대조군으로 사용하였다. 분화 마커의 mRNA 발현량은 음성 대조군의 mRNA 발현량을 1.0으로 기준하여 수치화하여 나타내었다(Figure 4). 먼저, keratin 10의 mRNA 발현량을 보면, calcium을 처리한 양성 대조군에서 음성 대조군 대비 keratin 10의 mRNA 발현량이 5.7배 증가하였고, chrysin을 처리한 실험군에서도 keratin 10의 mRNA 발현량이 음성 대조군 대비 2.6배 증가하였다. Involucrin의 mRNA 발현을 보면, calcium을 처리한 양성 대조군에서 involucrin의 mRNA 양이 4.3배 증가하였고, chrysin 처리군에서도 involucrin의 mRNA 양이 3.7배 증가하였다. Filaggrin의 mRNA 발현량도, 양성 대조군인 calcium 처리군에서 음성 대조군 대비 5.7배 증가하였고, chrysin을 처리한 실험군에서도 음성 대조군 대비 4.9배 증가하였다. 이로써, chrysin이 각질형성세포의 분화 마커인 keratin 10, involucrin 그리고 filaggrin의 발현을 증가시킨다는 것을 알 수 있고, 이것은 chrysin이 각질형성세포의 분화를 촉진시킨다는 것을 시사한다.

Vitamin D와 관련된 여러 논문에 의하면, vitamin D 또한 각질형성세포의 분화를 촉진한다고 알려져 있다 [31,32]. 우리는 활성형 vitamin D인 1,25(OH)₂D를 1 × 10⁻⁷ M 농도로 chrysin을 처리한 방법과 동일하게 각질형성세포에 처리하여 각질형성분화 마커인 involucrin의 mRNA 발현량을 살펴보았고, vitamin D가 involucrin의 발현을 증가시킨다는 다른 연구[33,34]와 동일한 결과를 얻었다(data not shown). Involucrin의 promoter에는 VDRE가 존재하여 VDR에 의해 involucrin의 발현이

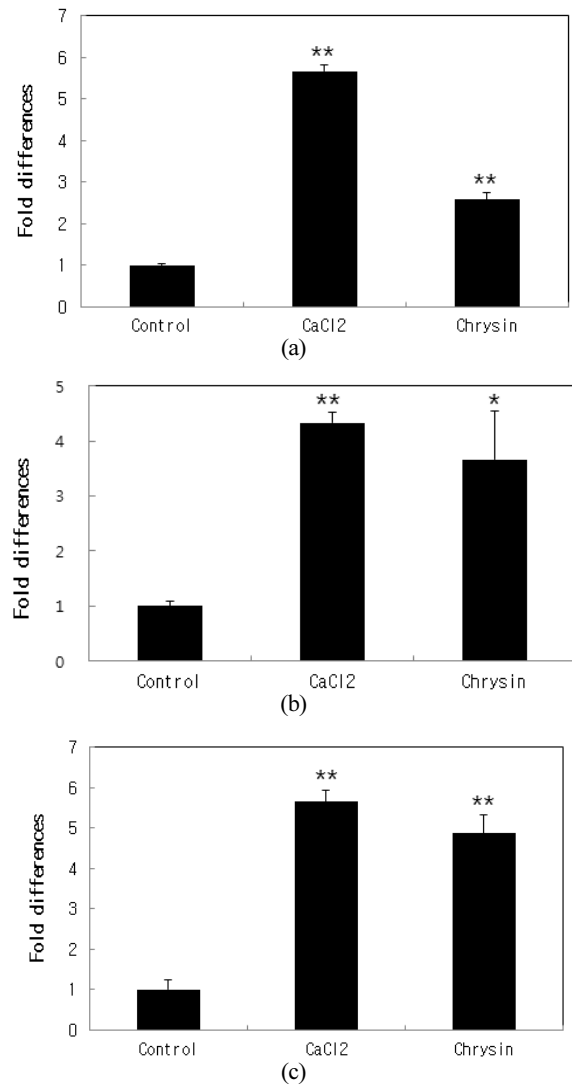


Figure 4. Chrysin increases the mRNA expression of differentiation markers in normal human epidermal keratinocytes. Normal human epidermal keratinocytes were cultured in the presence or absence of 1 × 10⁻⁷ M 1,25(OH)₂D or 2 µg/mL of chrysin for 3 d under low Ca²⁺ (0.06 mM) or high Ca²⁺ (1.5 mM). The mRNA expression level of the control was designated as 1.0. (a) Keratin 10, (b) Involucrin, (c) Filaggrin. Data are shown as the means ± S. D. of three samples (*p < 0.05, **p < 0.01).

증가할 수 있다[35]. 이것은 chrysin이 VDR의 transcriptional activity를 증가시키는 vitamin D 작용 기전을 통하여 각질형성세포에서 vitamin D와 유사하게 작용하여 각질형성세포의 분화를 촉진시킬 수도 있다는 것을 시사한다. 그러나 각질형성세포의 분화에 관여하는 작용

기전은 다양하기 때문에 chrysin이 표피 각질형성세포의 분화를 촉진시키는 정확한 기전에 대해서는 향후 지속적인 연구를 통한 규명작업이 필요할 것으로 사료된다.

4. 결 론

Chrysin은 항산화, 항노화, 항염, 항암 효과 등 여러 가지 효능에 대해 많은 연구가 이루어져 있으나, 각질형성세포에서의 작용에 대한 연구는 미미하다. 본 연구에서는 chrysin이 각질형성세포에서 VDR을 통한 transcriptional activity와 VDR의 발현을 증가시키는 것을 확인했다. 이것은 chrysin이 vitamin D가 작용하는 기전인 VDR을 통해 각질형성세포에 작용할 수 있음을 나타낸다. 또한, chrysin을 각질형성세포에 처리하였을 때, 각질형성세포에서 분화 마커인 keratin 10, involucrin과 filaggrin의 발현이 증가하였다. 이것은 chrysin이 각질형성세포의 분화를 촉진시킬 수 있다는 것을 나타내며, chrysin이 VDR의 transcriptional activity를 증가시키는 vitamin D의 작용 기전을 통하여 각질형성세포에서 vitamin D와 유사하게 작용하여 각질형성세포의 분화를 촉진시킬 수 있다는 것을 시사한다.

참 고 문 헌

1. C. Skibola and M. Smith, Potential health impacts of excessive flavonoid intake, *Free Radic. Biol.*, **29**, 375 (2000).
2. L. Bravo, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr. Rev.*, **56**, 317 (1998).
3. A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Remesy, and L. Jimenez, Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45**, 287 (2005).
4. E. H. Kelly, R. T. Anthony, and J. B. Dennis, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structureactivity relationship, *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 572 (2002).
5. J. Robert, N. Els, E.C. Danny, G. B. Petra, N. Klaske, and A. M. Paul, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin. Nutr.*, **74**, 418 (2001).
6. S. K. Jaganathan and M. Mandal, Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2009**, 830616 (2009).
7. L. Estevinho, A. P. Pereira, L. Moreira, L. G. Dias, and E. Pereira, Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 3774 (2008).
8. K. J. Woo, Y. J. Jeong, J. W. Park, and T. K. Kwon, Chrysin induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 1215 (2004).
9. P. Goncalves, J. R. Araujo, M. J. Pinho, and F. Martel, *In vitro* studies on the inhibition of colon cancer by butyrate and polyphenolic compounds, *Nutr. Cancer*, **63**, 282 (2011).
10. M. Ca'rdenas, M. Marder, V. C. Blank, and L. P. Roguin, Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 2966 (2006).
11. H. Cho, C. W. Yun, W. K. Park, J. Y. Kong, K. S. Kim, Y. Park, S. Lee, and B. K. Kim, Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives, *Pharmacol Res.*, **49**, 37 (2004).
12. N. Wu, J. Fang, M. Chen, C. Wu, C. Huang, and C. Huang, Chrysin protects epidermal keratinocytes from UVA- and UVB-induced damage, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 8391 (2011).
13. J. A. MacLaughlin, R. R. Anderson, and M. F. Holick, Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin, *Science*, **216**, 1001 (1982).
14. D. D. Bikle, M. K. Nemanic, E. Gee, E, and P. Elisa, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ production by human keratinocytes kinetics and regulation, *J. Clin. Invest.*, **78**, 557 (1986).
15. D. D. Bikle, M. K. Nemanic, J. O. Whitney, and P. W. Elisa, Neonatal human foreskin keratinocytes produce 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *Biochemistry*, **25**, 1545 (1986).

16. B. Lehmann, T. Genehr, P. Knuschke, J. Pietzsch, and M. Meurer, UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in an *in vitro* human skin equivalent model, *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 1179 (2001).
17. K. Matsumoto, Y. Azuma, M. Kiyoki, H. Okumura, K. Hashimoto, and K. Yoshikawa, Involvement of endogenously produced 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the growth and differentiation of human keratinocytes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1092**, 311 (1991).
18. G. K. Fu, D. Lin, M. Y. Zhang, D. D. Bikle, C. H. Shackelton, W. L. Miller, and A. A. Portale, Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1, *Mol. Endocrinol.*, **11**, 1961 (1997).
19. K. Kragballe, Calcipotriol: a new drug for topical psoriasis treatment, *Pharm. Toxicol.*, **77**, 241 (1995).
20. M. Bagot, D. Charue, M. C. Lescs, R. Pamphile, and J. Revuz, Immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogue calcipotriol on epidermal cells, *Br. J. Dermatol.*, **130**, 424 (1994).
21. M. R. Walters, Newly identified actions of the vitamin D system, *Endocr. Rev.*, **13**, 719 (1992).
22. K. Kragballe, Treatment of psoriasis with calcipotriol and other vitamin D analogues, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **27**, 1001 (1992).
23. P. C. M. Van Der Kerkhof, Biological activity of vitamin D analogues in the skin, with special reference to antipsoriatic mechanisms, *Br. J. Dermatol.*, **132**, 675 (1995).
24. C. Carlberg, Mechanisms of nuclear signalling by vitamin D₃. Interplay with retinoid and thyroid hormone signalling, *Eur. J. Biochem.*, **23**, 517 (1995).
25. S. Christakos, M. Raval-Pandya, R. P. Werny, and W. Yang, Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *Biochem. J.*, **31**, 361 (1996).
26. I. Nemere, L. X. Zhou, and A. W. Norman, Non-transcriptional effects of steroid hormones, *Receptor*, **3**, 277 (1993).
27. A. W. Norman, I. Nemere, J. E. Bishop, K. E. Lowe, A.C. Maiyar, E. D. Collins, T. Taoka, I. Sergeev, and M. C. Farach-Carson, 1,25-(OH)₂-vitamin D₃: a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways, *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, **41**, 231 (1992).
28. P. Boukamp, R. T. Petrussevska, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig, Normal kertainization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J. Cell Biol.*, **106**, 761 (1988).
29. M. Seifert, W. Tilgen, and J. Reichrath, Expression of 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase(1 α OHase, CYP27B1) splice variants in HaCaT keratinocytes and other skin cells: modulation by culture conditions and UV-B treatment *in vitro*, *Anticancer Res.*, **29**, 3659 (2009).
30. H. Hennings, D. Michale, C. Cheng, P. Steinert, K. Holbrook, and S. H. Yuspa, Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture, *Cell*, **19**, 245 (1980).
31. M. J. Su, D. D. Bikle, M. L. Mancianti, and S. Pillai, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ potentiates the keratinocyte response to calcium. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14723 (1994).
32. Y. Yada, T. Ozeki, S. Meguro, S. Mori, and Y. Nozawa, Signal transduction in the onset of terminal keratinocyte differentiation induced by 1 α -25-dihydroxyvitamin D₃: Role of protein kinase C translocation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 1517 (1989).
33. S. Pillai, D. D. Bikle, and P. M. Elias, 1,25-Dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation, *J. Biol. Chem.*, **263**, 5390 (1988).
34. M. J. Su, D. D. Bikle, M. L. Mancianti, and S. Pillai, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ potentiates the keratinocyte response to calcium, *J. Biol. Chem.*, **269**, 14723 (1994).
35. D. D. Bikle, Ng. Y. Oda, K. Hanley, K. Feingold, and Z. Xie, The vitamin D response element of involucrin gene mediates its regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *J. Invest. Dermatol.*, **119**, 1109 (2002).