

인간 피부각질세포 HaCaT Cell에서 TNF- α /IFN- γ 로 유도된 염증 반응에 대한 펄스형 전자기장(PEMF) 자극의 염증 인자 완화 효과

김준영¹ · 박찬호² · 박창순¹ · 이용흠^{1*}

¹연세대학교 의공학과, ²연세대학교 원주의과대학 해부학교실

Effect of Pulsed Electromagnetic Field Stimulation on TNF- α /IFN- γ induced inflammatory response in human skin keratinocytes HaCaT Cell to reduce inflammatory factors

Jun Young Kim¹, Chan Ho Park², Chang Soon Park¹ and Yong Heum Lee^{1*}

¹Department of Biomedical Engineering, Yonsei University, Republic of Korea

²Department of Anatomy, Yonsei University Wonju College of Medicine, Korea

(Manuscript received 26 November 2023 ; revised 10 December 2023 ; accepted 11 December 2023)

Abstract: The purpose of this study was to observe cell death in human keratinocytes stimulated against the infectious cytokines TNF- α and IFN- γ , and to observe the expression of Phospho-NF- κ B due to phosphorylation of I κ B to confirm the mechanism of inhibiting the expression of inflammatory cytokines. As a result of cell viability analysis, differences in PEMF stimulation time were observed little by little after 1 hour, 3 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, and 48 hours, but there was no statistical significance according to PEMF stimulation time for each time ($p > 0.05$). No significant difference was observed in the total amount of NF- κ B present in the cytoplasm and nucleus, but a significant decrease in the expression of phosphorylated NF- κ B was observed in the group exposed to PEMF stimulation for 24 hours ($*p < 0.05$). The expression of IL-1 β was observed in all inflammation-induced groups, and the concentration of IL-1 β compared to α -Tubulin expression was reduced by about 54% in the PEMF-stimulated group for 24 hours compared to the control group ($***p < 0.001$). As a result of the study, it is shown that PEMF stimulation does not negatively affect HaCaT cells from 0 to 48 hours and can inhibit the expression of inflammatory cytokines by inhibiting the pathway of NF- κ B.

Key words: TNF- α , IFN- γ , NF- κ B, IKK- α/β , Pulsed electromagnetic fields (PEMF)

1. 서 론

피부는 외부환경 또는 물리적, 화학적 자극으로부터 인체를 보호하는 물리적 장벽의 역할을 수행한다. 중층평상피로

구성된 바깥층 표피를 형성하는 피부각질형성세포는 항원에 직접적으로 노출되어 있으며[1-3], 다양한 Cytokine과 Chemokine 등의 염증성 매개 인자를 생성하여 염증반응과 면역반응에 관여한다[4-7]. 피부각질형성세포가 외부 스트레스 요인에 지속적으로 노출되면 외부 항원에 대한 저항성이 크게 저하되고, Tumor necrosis factor(TNF)- α , Interferon(IFN)- γ 와 같은 전 염증성 사이토카인의 과다 분비로 인해 염증이 발생된 병변으로 T-cell과 백혈구의 침윤이 유도된다[8-12]. 뿐만 아니라, 피부 기질 형성 장애 및 손상된 피부나 병변의 치유 속도가 감소 되어 아토피성 피부염과 같은 만성 염증성 피부 질환의 발병률이 높아질 수 있다[13-15].

염증에 의한 중요한 지표로서 대두되는 Nuclear factor

*Corresponding Author : Yong Heum Lee
Department of Biomedical Engineering, College of Software and Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, 26493, Yonseidae-gil 1, Wonju-si, Gangwon-do, Republic of Korea
Tel: +82-33-760-2863, Fax: +82-33-760-2920
Email: koaim@yonsei.ac.kr

본 연구는 2023년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업(2022RIS-005)과 연세대학교 미래융합연구원(ICONS)의 지원을 통해 수행되었습니다.

(NF)- κ B의 경로는 염증 반응에서 염증성 사이토카인을 분비 하는데 핵심 인자로서 알려져 있다[16]. NF- κ B는 Inhibitor- κ B(I- κ B)에 결합 된 상태로 세포질에 존재하며, 세포핵 내로 유입될 수 없다[17-19]. 염증 반응이 유도되면, Inhibitor of κ B kinase(IKK) α/β 의 인산화가 I κ B의 인산화를 유도하여 결합 된 NF- κ B가 분리된다[20]. 이 과정에서 분리된 NF- κ B는 세포핵 내로 유입되어 염증 반응을 유도하는 유전자를 전사하고, Interleukin(IL)-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인을 분비하게 된다[21-23]. 따라서, 이러한 NF- κ B의 경로는 염증반응의 주요 지표로서 주목되며, IKK 억제를 할 수 있는 면역억제제가 대표적인 치료 약물 중 하나로 알려져 있다[24].

그러나, 현재까지 통용되는 약물치료의 경우 완치가 불가능하며, 약물 내성에 의한 호전도가 점차 감소함으로써 약물 투입량 증가에 따른 다양한 부작용을 초래할 수 있다[25]. 따라서 약물치료의 한계를 극복할 수 있는 새로운 대체 수단에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는, 선행 연구를 통해 항염 및 조직재생에 효과가 있음이 규명된 펄스형 전자기장(Pulsed electromagnetic fields(PEMF)) 자극을 통해 인간 피부 각질형성세포 HaCaT에서 염증성 사이토카인의 발현 조절 여부를 통한 항염 효과와 PEMF 자극이 세포 독성에 미치는 여부를 관찰하여 전자기장 자극의 부작용 여부를 관찰하고자 하였다[26-29]. PEMF 자극 시간이 HaCaT 세포에 미치는 생존율 감소 여부를 확인하기 위해 CCK-8 assay를 수행하였고[30], 이를 바탕으로 염증성 사이토카인 자극에 의한 염증 인자 발현 억제 효과를 확인하기 위해, 거의 모든 동물세포에서 발견되며 염증 반응의 척도를 나타내는 NF- κ B 경로를 관찰하고자 NF- κ B의 인산화 발현과 IL-1 β 를 관찰하였다[31-33].

연구 결과, PEMF 자극에 의한 세포 생존률과 염증 반응에 의해 나타나는 인산화 된 NF- κ B, 및 IL-1 β 발현에 대한 유

의한 차이가 나타나 이를 보고하고자 한다.

III. 연구 재료 및 방법

1. 펄스형 전자기장(PEMF) 시스템

인간 피부각질형성 세포인 HaCaT cell에 균일한 자기장 자극을 인가하기 위해 실험 프로토콜에 적합한 펄스형 전자기장 발생 시스템을 설계하였다(그림 1A). 본 시스템은 총 6개의 채널을 통해 자기장 발생 코어를 동시에 제어할 수 있도록 설계되어 PEMF 자극 파라미터를 실험에 맞게 가변할 수 있다. 시스템에서 자기장 발생 코어에 인가되는 전압 및 전류를 단계별로 제어할 수 있으며, PEMF 자극 강도는 최소 5 mT 부터 50 mT까지 가변 될 수 있도록 설계되었다. 또한, 세포배양기 내부의 온도보다 낮은 온도에서 항시 작동할 수 있도록 펄스폭 변조가 가능하도록 설계하였다. 이를 통해 각 출력단의 Duty ratio는 10%~50%로 가변할 수 있으며, 항시 작동 시 발생하는 시스템의 발열 문제를 해결할 수 있다. 6개의 출력단에 연결된 PEMF 발생 코어의 경우, 본 실험에 사용된 60 mm 세포배양 접시의 크기에 맞도록 외경 60 mm의 자기장 발생 코어 6개가 사용되었다(그림 1B). 본 실험에서 적용된 자기장 자극은 선행 연구를 바탕으로 발열 및 생체 내 주파수를 고려하여 30%의 Duty ratio와 30 Hz의 주파수가 적용된 10 mT의 단극성 자극을 적용하였다(그림 1C).

2. 시약 및 항체

재조합 단백질 TNF- α (210-TA-020/CF)와 IFN- γ (285-IF-100/CF)는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구매하였다. NF- κ B(#8242, 1:1000), Phospho-NF- κ B (#3033, 1:1000), NF- κ B1(#13586, 1:1000), α -Tubulin(#2144, 1:1000), Phospho-IKK α/β (#2697, 1:1000), IKK β (#2370, 1:1000),

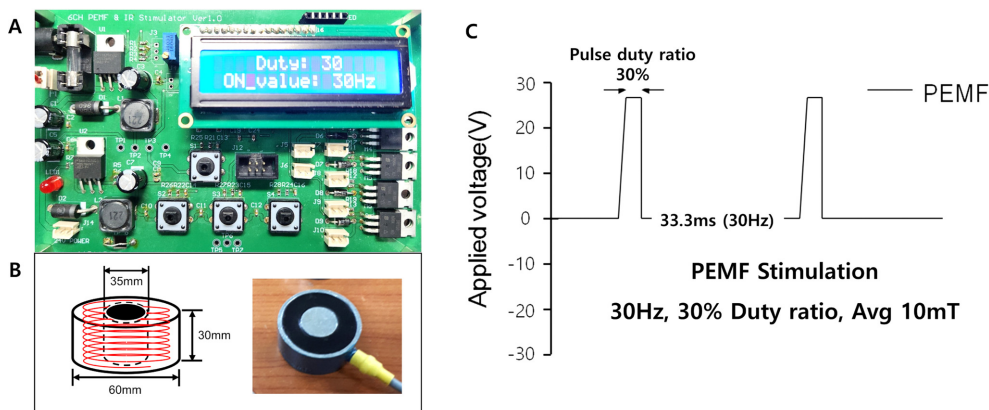


그림 1. 펄스형 전자기장 통합 시스템 (A) 펄스형 전자기장 제어 시스템, (B) 펄스형 전자기장 발생 코어, (C) 펄스형 전자기장 파라미터
 Fig. 1. Pulsed electromagnetic fields integrated system (A) pulsed electromagnetic fields control system, (B) pulsed electromagnetic fields generating core, (C) pulsed electromagnetic fields parameters

IKK α (#61294, 1:1000)에 대한 1차 항체는 Cell Signaling Technology Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구매하였고 Rabbit IgG에 대한 HRP conjugated 2차 항체는 GenDepot (SA002-500, 1:2500, Katy, TX, USA)에서 구매하여 사용하였다. Cell lysis 과정에 포함된 Xpert Protease Inhibitor Cocktail Solution(100X, P3100-001)와 Xpert Phosphatase Inhibitor Cocktail Solution(P3200-001)은 GenDepot (Katy, TX, USA)에서 구매하였다.

3. 세포배양

인간 keratinocyte 세포주 HaCaT(300493, CLS Cell Lines Service, Eppelheim, Germany)을 분양받아서 사용하였다. 세포는 10% FBS(16000044, Gibco, MA, USA)와 1% Antibiotics(15140122, Gibco, MA, USA)가 포함된 DMEM F/12 1:1(12634010, Gibco, MA, USA)를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다[34,35]. 세포 계대 배양 단계에서는 0.25% Trypsin-EDTA(25200056, Gibco, MA, USA)를 이용하여 부착 세포를 부유 상태로 만든 후, 1250 rpm에서 5분간 원심분리를 통해 세포 Pellet을 만들었다. 세포계수기를 통하여 세포를 1×10⁶ cells/mL로 분주하여 100 mm 크기의 세포배양 접시에 계대 배양하였다.

4. 실험 과정

100 mm 세포배양 접시에 계대 배양한 HaCaT 세포를 PEMF 코어 크기에 맞는 60 mm 세포배양 접시에 옮긴 뒤, 세포 안정화 과정을 거쳤다. 실험 그룹은 대조군인 Control 그룹과 PEMF 자극이 인가되는 PEMF 그룹으로 나뉘었다. 각 그룹은 TNF- α /IFN- γ (10 ng/mL)에 노출된 염증 유도군과 처리되지 않은 대조군으로 나뉘어 총 4개의 그룹을 통해 염증 유도에 따른 세포의 변화와 PEMF 자극에 의한 염증 인자 완화 효과를 관찰하고자 하였다. Control, PEMF 그룹의 염증 유도군은 TNF- α /IFN- γ 에 24시간 동안 노출되었으며, 약물 처리와 동시에 PEMF 자극을 24시간 동안 인가하였다. 염증 유도 이후, 모든 세포에서 각 그룹 및 처리군에

따라 표적 단백질 분석을 위한 세포 내 단백질을 추출하였다 (그림 2).

5. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 CCK-8 실험법을 사용하여 측정하였다[36]. HaCaT 세포를 96 well plate 각 well에 1×10⁴ cells/mL로 분주하고 24시간 동안 배양하여 세포 안정화를 진행하였다. 그 후, PEMF 자극에 의한 세포 사멸 및 생존율을 분석하고자 대조군에 48시간 동안 PEMF 자극을 인가하였다. 모든 세포는 PEMF 자극 시간 동안 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다. PEMF 자극 시간이 끝난 후, 각 well에 들어있는 100 μ L 배양액에 CCK-8(CK04-01, Dojindo, Kumamoto, Japan) 10 μ L을 첨가하였다. 37°C 항온 항습 배양기에서 1시간 배양 후, Microplate reader(SpectraMax ABS Plus, Molecular Devices, LLC, USA)를 이용하여 450nm에서 O.D값을 각각 3번씩 측정하였다.

6. 세포의 형태학적 변화에 따른 현미경적 관찰

HaCaT 세포에 TNF- α /IFN- γ (10 ng/mL) 처리와 PEMF 자극에 따른 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해, 세포를 60 mm 세포배양 접시에 배양하였다. 이후, TNF- α /IFN- γ 처리와 PEMF 자극을 동시에 진행한 뒤, 0시간, 1시간, 3시간, 6시간 12시간, 24시간, 48시간 동안 진행하여 도립현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 400배의 배율에서 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

7. Western blots

HaCaT cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM F/12 1:1 배양액을 사용하여 60mm 세포배양 접시에 1×10⁵ cells/mL 이 되도록 분주한 뒤, 5% CO₂, 37°C 세포 배양기에서 24시간 배양하여 세포 안정화를 진행하였다[37]. 세포 안정화가 진행된 후, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배양액에 TNF- α 및 IFN- γ (10 ng/mL)을 희석하여 처리하였고, PEMF 자극을 동시에 진행하여 5% CO₂, 37°C 조건의 배양기에서 24

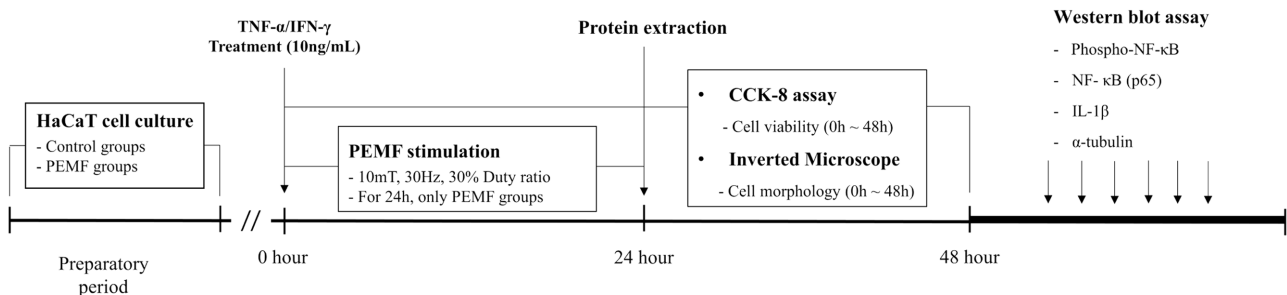


그림 2. 전체 실험 과정

Fig. 2. The entire experimental process

시간 배양하였다. 이후 PBS로 2번 세척한 뒤, RIPA buffer (89900, Thermo Scientific, MA, USA)를 각 well에 150 μ L씩 넣은 후 Cell scraper로 세포를 추출하였다. 멸균된 1.5 mL Microtube에 떨어진 세포를 옮겨주고 1 mL syringe를 사용해 homogenize를 진행하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 Cell lysis 진행을 유도하고 4 $^{\circ}$ C, 12500 rpm에서 15분간 원심분리를 통해 단백질을 포함한 상층액으로 분리하였다. 분리된 단백질을 PierceTM BCA Protein Assay Kits(23225, Thermo Scientific, MA, USA)를 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 20 μ g으로 일정하게 loading 하기 위해 일정한 단백질량을 5X Sample Buffer(1% bromophenol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol)에 5:1 비율로 혼합하였다. 각각의 단백질 샘플은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 boiling 한 뒤 초저온 냉동고에 저장하였다. 7.5% SDS-PAGE Gel를 사용하여 100V 조건에서 1시간 30분 동안 전기영동을 진행한 후 Electrotransfer system을 사용하여 PVDF membrane에 350 mA로 1시간 30분 동안 transfer를 진행하였고, 5% skim milk를 사용하여 상온에서 1시간 동안 Blocking 단계를 진행하였다. 1차 항체는 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 shaking incubation을 진행하였다. 1x TBS-T(Tween-20)을 사용하여 3번 세척 하였고 2차 항체는 상온에서 1시간 shaking incubation 진행하였다. 발색을 통해 단백질 발현량을 확인하기 위해 Pico alpha ECL(DG-WPAL120, Dogenbio, seoul, Korea) Solution을 1:1 비율로 희석하여 사용하였다. Develop 단계는 ChemiDoc XRS+ Imaging System(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

8. 통계 분석

본 연구의 모든 결과는 GraphPad Prism 5(GraphPad, San Diego, California, USA)를 통해 분석하였으며, 평균 \pm 표준편차를 포함하여 표기하였다. 모든 그룹 간의 결과 비교 분석은 One way ANOVA(Tukey's multiple comparison test)를 이용하여 대비 검정을 시행하였고, 통계적 유의성은 유의 수준에 따라 각기 표기하였다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

III. 연구 결과 및 고찰

1. PEMF 자극에 의한 세포 사멸 분석 결과(CCK-8 assay)

CCK-8 assay를 통해 PEMF 자극에 따른 HaCaT 세포의 생존율을 분석하였고, 이러한 결과를 가시적으로 나타내기 위해 형태학적 변화를 동시에 관찰하였다. 세포 사멸 분석에서는 TNF- α 및 IFN- γ 를 처리하지 않았으며, PEMF 자극 유/무에 의한 차이를 통해 PEMF가 세포에 미치는 생존율 변화를 분석하고자 하였다. 분석 결과, Control(Non-PEMF) 군의 경우, 배양 0시간부터 48시간까지 측정 시간별 평균 101.48%의 생존율을 유지하였다. 48시간 동안 PEMF 자극이 인가된 Control + PEMF 군에서는 48시간까지 측정 시간별 평균 100.72%의 생존율이 유지되었다. 통계 분석 결과, 측정 시간별 세포 생존율에서 두 그룹에 대한 통계적 유의성이 나타나지 않았다(그림 3A)(p>0.05). 이에 대한 세포의 형태학적 변화에서도 시간이 경과 함에 따라 세포의 분화가 비슷한 양상으로 증식되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 3B). 이러한 결과를 종합하였을 때, PEMF 자극은 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 보여지며, 세포 증식에 대해 별다른 영향이 나타나지 않는 것으로 보여진다. 해당 결과는 TNF- α /IFN- γ 의 염증 유도 과정에서 PEMF 자극이 세포에 대한 부정적인 영향을 미치는 요인으로써 작용하지 않을 것으로 사료된다.

2. NF- κ B 발현량 및 인산화 분석 결과

염증 유도된 HaCaT 세포에서 PEMF 자극에 대한 NF- κ B 경로의 억제를 관찰하고자 표적 단백질의 발현량을 분석하였다(그림 4A). TNF- α /IFN- γ 유/무와 PEMF 자극 유/무에 따른 4가지 군에서 α -Tubulin 발현량 대비 NF- κ B의 발현량을 비교한 결과, 세포질 및 핵 내에 존재하는 NF- κ B 총량의 유의한 차이가 나타나지 않았다(그림 4C)(p>0.05). TNF- α /IFN- γ 처리된 군에서 공통적인 NF- κ B 발현량이 소폭 증가된 형태로 나타났으나, α -Tubulin 발현량의 농도 의존적 차이가 주된 요인으로 사료 된다. 하지만, NF- κ B 발현량 차이에 대해 통계적 유의성이 나타나지 않았기 때문에,

446

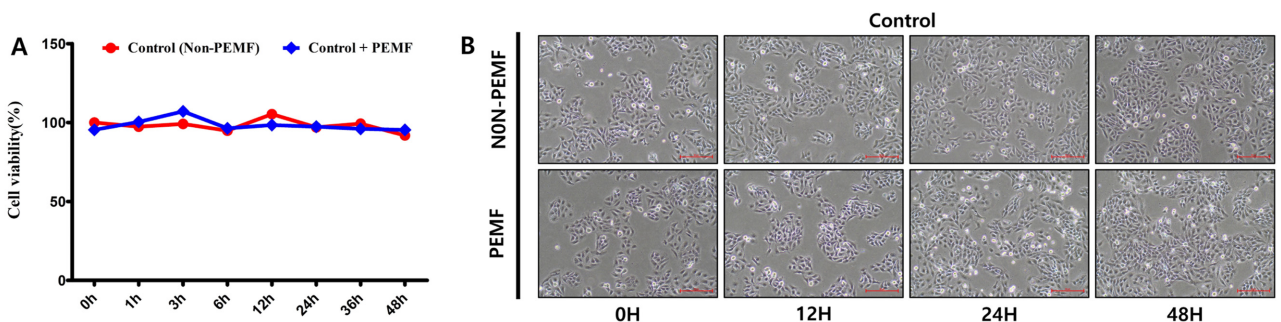


그림 3. PEMF 자극에 의한 세포 사멸 평가 (A) CCK-8 분석 결과, (B) HaCaT 세포의 형태학적 관찰 결과
 Fig. 3. Evaluation of Cell Death by PEMF Stimulation (A) Results of CCK-8 analysis, (B) morphological results of HaCaT cells

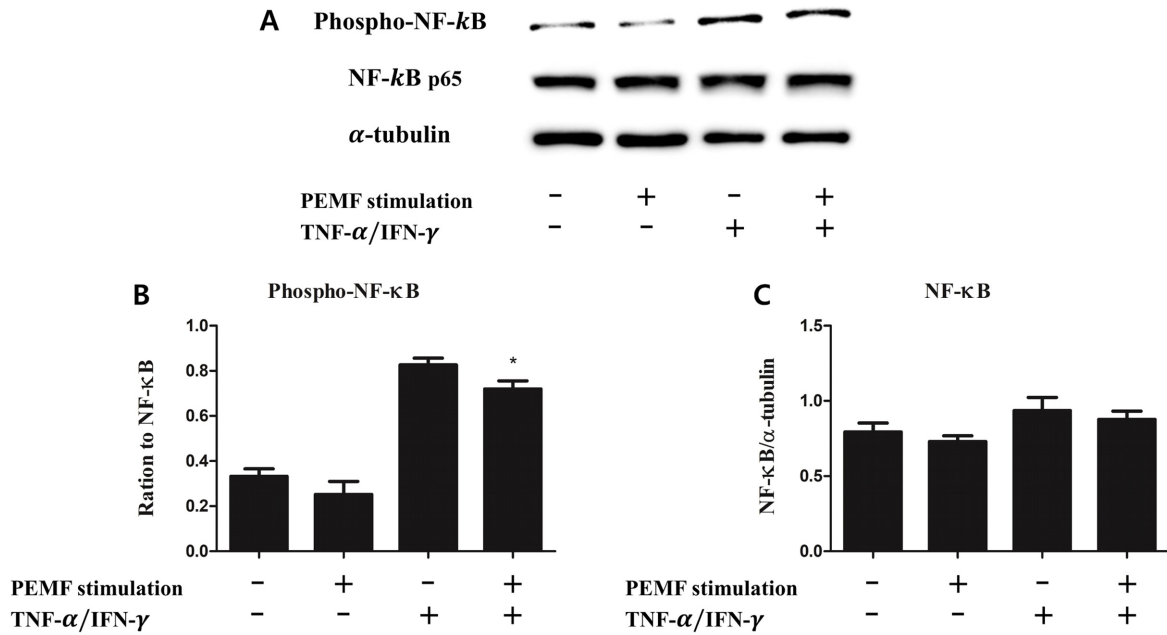


그림 4. NF-κB 발현량 및 인산화 분석 결과 (A) Western blot 결과, (B) 인산화된 NF-κB 발현량 통계 분석 결과, (C) NF-κB 발현량 통계 분석 결과

Fig. 4. Results of NF-κB Expression and Phosphorylation Analysis (A) Western blot results, (B) Statistical Analysis of Phosphorylated NF-κB Expression, (C) Statistical Analysis of NF-κB Expression

인산화 발현량 분석에 부정적인 영향을 미친다고 볼 수 없다. NF-κB 발현량 대비 인산화 발현량을 분석한 결과, TNF-α/IFN-γ로 염증 유도된 두 가지 군에서 약물 처리되지 않은 군에 비해 급격한 인산화 증가가 나타났다. 한편, PEMF 자극이 24시간 동안 이루어진 군에서 인산화된 NF-κB의 발현량의 유의한 감소를 확인하였다(그림 4B)(*p<0.05). 이러한 결과는 전 염증성 사이토카인에 의해 염증이 유도됨에 따라 세포질 내에 존재하는 NF-κB가 활성화되어 세포핵 내로 유입된 결과를 나타낸다. 이때, PEMF 자극이 인산화된 NF-κB의 발현량의 감소를 유도한 결과는 세포핵 내에서 염증성 사이토카인의 전사 과정을 억제한 결과로 사료 된다.

3. IL-1β 발현량 분석 결과

NF-κB 인산화 발현량과 NF-κB 경로에 의한 세포핵 내에서 전사되는 염증성 사이토카인 중 하나인 IL-1β의 발현량을 통해 PEMF 자극이 염증 반응에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 인산화된 NF-κB의 발현량에 비해, TNF-α/IFN-γ로 염증이 유도되지 않은 군 모두에서 IL-1β가 발견되지 않았다(그림 5A). 반면, 염증 유도가 이루어진 군에서는 모두 IL-1β의 발현이 관찰되었는데, 24시간 동안 PEMF 자극이 인가된 그룹에서 대조군보다 α-Tubulin 발현량 대비 IL-1β의 농도가 약 54% 감소한 결과가 관찰되었다(그림 5B)(***p<0.001). 이러한 결과는 인산화된 NF-κB의 발현량

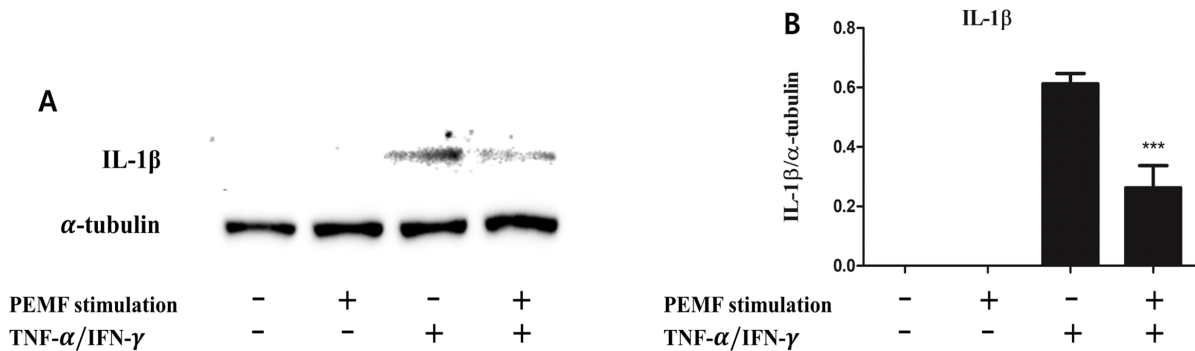


그림 5. IL-1β 발현량 분석 결과 (A) Western blot 결과, (B) IL-1β 발현량 통계 분석 결과

Fig. 5. IL-1β expression level analysis results (A) Western blot results, (B) Statistical Analysis Results of IL-1β Expression

결과가 나타내듯, 세포질 내에 존재하는 NF- κ B가 I κ B의 결합으로부터 활성화되어 핵 내로 유입된 결과를 시사하며, PEMF 자극이 NF- κ B의 경로를 저해함으로써 친 염증성 유전자의 발현을 억제하고, 그로 인해 생성되는 염증성 사이토카인의 발현을 억제시키는 것으로 사료 된다.

IV. 결 론

본 연구에서는 전 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IFN- γ 에 의해 유도된 인간의 각질형성세포인 HaCaT 세포에서 PEMF 자극에 의한 세포 사멸 및 형태학적 영향성을 관찰하고, PEMF 자극이 NF- κ B의 경로를 저해시킬 수 있는지 여부를 확인하고자 하였다. 연구 결과, 0~48시간까지 HaCaT 세포의 증식을 억제하거나 세포 사멸을 일으키지 않는 결과가 관찰되어 세포의 형태학적 측면에서 부정적인 영향을 미치지 않는 결론을 얻을 수 있었다. 결론적으로, PEMF 자극은 본 실험에서 관찰한 48시간까지의 자극 범위에서는 세포에 부작용을 야기하지 않았다. 또한, NF- κ B 경로에 대해 관찰된 결과를 종합하였을 때, α -Tubulin 발현량의 농도 의존적 차이로 인한 NF- κ B 발현량의 차이가 주된 요인으로 나타났으며, 관찰된 NF- κ B 농도에 PEMF 자극이 직접적인 요인으로 작용했다고 볼 수 없다. 그 결과, NF- κ B 발현량 대비 인산화된 NF- κ B 발현량의 차이가 PEMF 자극에 의해 유의한 감소를 나타내었으므로, NF- κ B가 I κ B의 결합으로부터 분리되어 핵 내로 유입된 결과를 시사함을 알 수 있었다[38-40]. 이를 뒷받침 하는 증거로써, 핵 내에 전사된 유전자를 통해 발현되는 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 농도를 관찰하였다. IL-1 β 의 발현량은 PEMF 자극에 의해 약 54%의 감소를 보이며, 통계적으로 유의한 결과를 나타내었다. 모든 결과를 종합하였을 때, PEMF 자극은 0~48시간까지 HaCaT 세포에 부정적인 영향을 미치지 않고, NF- κ B의 경로를 저해함으로써 염증성 사이토카인의 발현을 억제시킬 수 있다고 보여진다. 그러나, 본 연구에서 PEMF 자극에 의해 I κ B의 인산화 결과로 나타나는 NF- κ B의 활성화를 관찰한 것이 아니기 때문에, PEMF 자극이 NF- κ B의 모든 경로에 영향을 준다고 결론지을 수 없다. 차후 연구에서는 PEMF 자극이 NF- κ B 경로에 미치는 영향을 자세히 밝혀내기 위해 I κ B의 인산화 발현량 분석과 IKK α , IKK β , 및 인산화된 IKK α / β 의 변화를 통해 NF- κ B의 기전을 관찰할 필요가 있다.

References

[1] Kashem SW, Haniffa M, Kaplan DH. Antigen-presenting cells in the skin. Annual review of immunology. 2017;35:469-499.

[2] Mathers AR, Larregina AT. Professional antigen-presenting cells of the skin. Immunologic research. 2006;36:127-136.

[3] Ariotti S, Beltman JB, Chodaczek G, Hoekstra ME, Van Beek AE, Gomez ER, Ritsma L, Van RJ, Marée AF, Zal T. Tissue-resident memory CD8+ T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109(48):19739-19744.

[4] Schroder JM. Cytokine networks in the skin. Journal of investigative dermatology. 1995;105(1):S20-S24.

[5] Hanel KH, Cornelissen C, Luscher B, Baron JM. Cytokines and the skin barrier. International journal of molecular sciences. 2013;14(4):6720-6745.

[6] Sebastiani S, Albanesi C, De Pita O, Puddu P, Cavani A, Girolomoni G. The role of chemokines in allergic contact dermatitis. Archives of dermatological research. 2002;293:552-559.

[7] Nedoszytko B, Sokołowska WM, Ruckemann DK, Roszkiewicz J, Nowicki R. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii. 2014;31(2):84-91.

[8] Campo GM, Avenoso A, Campo S, Angela DA, Ferlazzo AM, Calatroni A. TNF- α , IFN- γ , and IL-1 β modulate hyaluronan synthase expression in human skin fibroblasts: Synergistic effect by concomitant treatment with FeSO₄ plus ascorbate. Molecular and cellular biochemistry. 2006;292:169-178.

[9] Skurkovich B, Skurkovich S. Inhibition of IFN- γ as a method of treatment of various autoimmune diseases, including skin diseases. Cytokines as Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Skin Diseases. 2006:1-27.

[10] Van der ZH, De Ruiter L, Van Den BD, Dik W, Laman J, Prens E. Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: a rationale for targeting TNF- α and IL-1 β . British Journal of Dermatology. 2011;164(6):1292-1298.

[11] Ishida Y, Kondo T, Takayasu T, Iwakura Y, Mukaida N. The essential involvement of cross-talk between IFN- γ and TGF- β in the skin wound-healing process. The Journal of Immunology. 2004;172(3):1848-1855.

[12] Hijnen D, Knol EF, Gent YY, Giovannone B, Beijin SJ, Kupper TS, Bruijnzeel KCA, Clark RA. CD8+ T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- γ , IL-13, IL-17, and IL-22. Journal of Investigative Dermatology. 2013;133(4):973-979.

[13] Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. Immunological reviews. 2011;242(1):233-246.

[14] Evers A, Lu Y, Duller P, Van Der VP, Kraaimaat FW, Van De KP. Common burden of chronic skin diseases? Contributors to psychological distress in adults with psoriasis and atopic dermatitis. British Journal of Dermatology. 2005;152(6):1275-1281.

[15] Leung DY. Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. Journal of allergy and clinical immunology. 1995;96(3):302-319.

[16] Moynagh PN. The NF- κ B pathway. Journal of cell science. 2005;118(20):4589-4592.

[17] Yamamoto Y, Gaynor RB. Role of the NF- κ B pathway in the

- pathogenesis of human disease states. *Current molecular medicine*. 2001;1(3):287-296.
- [18] Senftleben U, Karin M. The I κ B/NF- κ B pathway. *Critical care medicine*. 2002;30(1):S18-S26.
- [19] Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(6):a001651.
- [20] Yamamoto Y, Gaynor RB. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29(2):72-79.
- [21] Zhou D, Yu T, Chen G, Brown S, Yu Z, Mattson M, Thompson J. Effects of NF- κ B1 (p50) targeted gene disruption on ionizing radiation-induced NF- κ B activation and TNF α , IL-1 α , IL-1 β and IL-6 mRNA expression in vivo. *International journal of radiation biology*. 2001;77(7):763-772.
- [22] Hiscott J, Marois J, Garoufalos J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G. Characterization of a functional NF- κ B site in the human interleukin 1 β promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(10):6231-6240.
- [23] Flodströma M, Welsh N, Eizirik DL. Cytokines activate the nuclear factor κ B (NF- κ B) and induce nitric oxide production in human pancreatic islets. *FEBS letters*. 1996;385(1-2):4-6.
- [24] Meier Kriesche HU, Li S, Gruessner R, Fung J, Bustami RT, Barr M, Leichtman AB. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *American Journal of Transplantation*. 2006;6(5):1111-1131.
- [25] Khurana A, Brennan DC. Current concepts of immunosuppression and side effects. *Pathology of solid organ transplantation*. 2010:11-30.
- [26] Kim JY, Lee JY, Lee JW, Lee SK, Park CS, Yang SJ, Lee YH. Evaluation of Atopic Dermatitis Improvement Caused by Low-Level, Low-Frequency Pulsed Electromagnetic Fields. *Bioelectromagnetics*. 2022;43(4):268-277.
- [27] Ross CL, Zhou Y, McCall CE, Soker S, Criswell TL. The use of pulsed electromagnetic field to modulate inflammation and improve tissue regeneration: A review. *Bioelectricity*. 2019;1(4):247-259.
- [28] Vincenzi F, Targa M, Corciulo C, Gessi S, Merighi S, Setti S, Cadossi R, Goldring MB, Borea PA, Varani K. Pulsed electromagnetic fields increased the anti-inflammatory effect of A2A and A3 adenosine receptors in human T/C-28a2 chondrocytes and hFOB 1.19 osteoblasts. *PloS one*. 2013;8(5):e65561.
- [29] Vincenzi F, Ravani A, Pasquini S, Merighi S, Gessi S, Setti S, Cadossi R, Borea PA, Varani K. Pulsed electromagnetic field exposure reduces hypoxia and inflammation damage in neuron-like and microglial cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2017;232(5):1200-1208.
- [30] Li S, Ni Z, Cong B, Gao W, Xu S, Wang C, Yao Y, Ma C, Ling Y. CCK-8 inhibits LPS-induced IL-1 β production in pulmonary interstitial macrophages by modulating PKA, p38, and NF- κ B pathway. *Shock*. 2007;27(6):678-686.
- [31] Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends in biochemical sciences*. 2005;30(1):43-52.
- [32] Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The regulation of NF- κ B subunits by phosphorylation. *Cells*. 2016;5(1):12.
- [33] Yasuda T. Hyaluronan inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages through down-regulation of NF- κ B via ICAM-1. *Inflammation Research*. 2007;56:246-253.
- [34] Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, Fumagalli M, Carlino C, Corsetto PA, Scaccabarozzi D. HaCaT cells as a reliable in vitro differentiation model to dissect the inflammatory/repair response of human keratinocytes. *Mediators of inflammation*. 2017;2017.
- [35] Wilson VG. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Epidermal Cells: Methods and Protocols*. 2014:33-41.
- [36] Cai L, Qin X, Xu Z, Song Y, Jiang H, Wu Y, Ruan H, Chen J. Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and CCK-8 method. *ACS omega*. 2019;4(7):12036-12042.
- [37] Kim H, Han TH, Lee SG. Anti-inflammatory activity of a water extract of *Acorus calamus* L. leaves on keratinocyte HaCaT cells. *Journal of ethnopharmacology*. 2009;122(1):149-156.
- [38] Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell*. 1997;91(2):243-252.
- [39] Magnani M, Crinelli R, Bianchi M, Antonelli A. The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor- κ B (NF- κ B). *Current drug targets*. 2000;1(4):387-399.
- [40] Gilmore TD. The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 1999;18(49):6842-6844.