



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

**Master's Thesis**

**Inhibitory effect action mechanism of dieckol on the  
production of MDC/CCL22 in interferon- $\gamma$   
stimulated HaCaT human keratinocytes**

**Dong-Hwan Koo**

**Department of Biomedicine & Drug development**

**Graduate School**

**Jeju National University**

**February, 2014**

Interferon- $\gamma$  로 자극된 인간각질세포 (HaCaT)에서  
dieckol에 의한 MDC/CCL22 생성 억제효과 및  
작용기전 연구




지도교수 유 은 숙

구 동 환

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2014 년 2 월

구동환의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	<u>강 희 경</u>	
위 원	<u>와 德 培</u>	
위 원	<u>유 은 숙</u>	

제주대학교 대학원

2014 년 2 월

**Inhibitory effect action mechanism of dieckol on the  
production of MDC/CCL22 in interferon- $\gamma$  stimulated  
HaCaT human keratinocytes**

**Dong-Hwan Koo**

(Supervised by professor **Eun-Sook Yoo**)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the  
degree of master of science in biomedicine & drug development

Date Approved:

Dec 26, 2013

Heekyoung Kang

DeokBAE PARK

EunSook Yoo

Department of Biomedicine & Drug development

Graduate School

Jeju National University

February, 2014

석사학위논문

Interferon- $\gamma$  로 자극된 인간각질세포 (HaCaT)에서  
dieckol에 의한 MDC/CCL22 생성 억제효과 및  
작용기전 연구

지도교수 유 은 숙

구 동 환

의생명.신약개발학과  
제주대학교 대학원

2014 년 2 월

## ABSTRACT

Macrophage-derived chemokine, C-C motif chemokine 22 (MDC/CCL22), is one of the inflammatory chemokines that controls the movement of monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. MDC/CCL22 is a ligand for CC chemokine receptor 4, which is expressed in T-helper type 2 cells. MDC/CCL22 in serum and skin lesions is elevated in atopic dermatitis, which suggests that chemokines produced from keratinocytes are responsible for attracting inflammatory lymphocytes to the skin. Keratinocyte is a cell type in the epidermis, the outer layer of the skin. Keratinocytes grow continuously by mitosis until they reach the upper epidermal layers. A major signaling pathway in the interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-stimulated inflammation response involves the signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1). IFN- $\gamma$  signals regulate phosphorylation of STAT1 and production of MDC/CCL22.

We investigated the inhibitory effect and mechanism of action of dieckol in IFN- $\gamma$ -stimulated HaCaT human keratinocytes. Dieckol inhibited MDC/CCL22 production, which was induced by 10 ng/mL of IFN- $\gamma$ . Effective concentrations (5 and 10  $\mu$ M) of dieckol suppressed the phosphorylation of STAT1 in a dose-dependent manner. STAT1 is an important key transcription factor in the IFN- $\gamma$  signaling pathway. Dieckol also slightly suppressed the phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) pathway. ERK is one of the MAP kinases.

Results suggest that dieckol affects the inflammation inhibition effect by regulating STAT1 phosphorylation and can prevent inflammation.

**Key words:** MDC/CCL22, keratinocyte, STAT1, dieckol, anti-inflammation

# 목 차

<b>A B S T R A C T</b> .....	i
<b>목 차</b> .....	ii
<b>LIST OF FIGURES</b> .....	iii
<b>I. 서 론</b> .....	1
<b>II. 재료 및 실험방법</b> .....	5
1. 시약 및 시료	
2. 세포배양과 세포 생존능 평가	
3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	
4. Western blot analysis	
5. 레이저초점 주사현미경(Confocal laser scanning microscopy) 검사	
6. 통계 처리	
<b>III. 결 과</b> .....	10
1. 각질형성세포의 세포 생존능에 미치는 dieckol의 영향	
2. MDC의 생성에 대한 dieckol의 억제 효과	
3. Dieckol이 STAT 신호전달 과정에 미치는 영향	
4. HaCaT 각질형성세포에서 STAT1의 핵 내부로의 이동에 대한 dieckol의 효과	
5. 각질형성세포에서의 MAP kinase 신호전달기전에 대한 dieckol의 효과	
6. MDC 생성량에 미치는 ERK 억제제의 영향	
<b>IV. 고 찰</b> .....	24
<b>V. 참 고 문 헌</b> .....	28

## LIST OF FIGURES

<b>Figure 1.</b> Chemical structure of eckol and dieckol .....	11
<b>Figure 2.</b> Effects of eckol and dieckol on the cell viability in HaCaT human keratinocytes .....	11
<b>Figure 3.</b> Effects of eckol and dieckol on the protein production of MDC in HaCaT human keratinocytes .....	13
<b>Figure 4.</b> Phosphorylation of STAT1 in interferon- $\gamma$ -stimulated HaCaT human keratinocytes .....	16
<b>Figure 5.</b> Effect of dieckol on the translocation of STAT1 phosphorylation in interferon- $\gamma$ -induced HaCaT human keratinocytes .....	18
<b>Figure 6.</b> Phosphorylation of MAP kinases in interferon- $\gamma$ -stimulated HaCaT human keratinocytes .....	20
<b>Figure 7.</b> Phosphorylation of ERK in interferon- $\gamma$ -stimulated HaCaT human keratinocytes .....	21
<b>Figure 8.</b> Effects of kinase inhibitors on the protein production of MDC in HaCaT human keratinocytes .....	23



# I. 서 론

케모카인 (chemokine)은 백혈구의 이동과 활성을 조절하는 인자의 한 그룹으로 염증세포의 조직 침윤을 조절하는 역할을 한다 (Yoshie, Imai & Nomiyama 2001). 이러한 케모카인은 구조적으로 아미노산 염기 서열 중에 첫 번째로 표현되는 두 개의 N-terminal 시스테인 (cysteine) 잔여기의 상대적인 배열 구조에 따라서 CXC-, CC-, CX3C-, C-의 네 종류의 하위 집단으로 나뉘게 되며, 현재까지 40여종 이상의 케모카인과 더불어 20여종 이상의 케모카인 수용체 (chemokine receptor)가 알려져 있다 (Zlotnik, Yoshie 2000). 또한 케모카인은 염증성 질환, 알러지성 질환, 감염성 질환 등의 여러 병리학적 증상에 밀접한 연관성이 있으며, 각각의 케모카인과 그에 연관되어 있는 수용체들의 반응으로 인해 면역 세포의 발생과 성숙, T 세포의 분화 및 이동 등에 관여하고 있음이 알려져 있다 (이일주 2002, Baumer et al. 2004). Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22)은 여러 종류의 케모카인 중 하나로, 단핵구 (monocyte)와 단핵구 유래의 수지상 세포 (dendritic cell) 및 자연 살해 세포 (Natural killer cell) 등에 대한 이동을 강하게 조절하는 케모카인이며, thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17)과 더불어 케모카인 수용체 중 하나인 C-C chemokine receptor type 4 (CCR4)와 결합하는 인자이다. MDC 발현은 염증성 자극을 유발한 마우스 모델의 RNA 수치와 폐에서의 발현량, 대식세포에서의 생성량 등이 대조군에 비해 증가하는 양상을 보이며, 아토피성 피부염 환자를 대상으로 한 실험에 있어서는 혈청에서 측정된 MDC 생성 수치가 대조군에 비교했을 때 약 1.7배 정도 상승하는 것으로 조사된 바 있다

(Shimada, Takehara & Sato 2004, Maeda et al. 2002, Jakubzick et al. 2004, Jahnz-Rozyk et al. 2005).

각질형성세포 (keratinocyte)는 피부 각질층의 구성에 있어서 필수적인 세포로, 피부에서 일어나는 면역 반응의 표적 세포로 작용한다. 각질형성세포는 외부의 다양한 자극에 의해서 interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )와 더불어 앞서 언급한 MDC, TARC와 같은 인자 (cytokine, chemokine)들을 분비하게 되며, 이러한 인자들의 생성량 또는 각각의 인자의 농도 증가는 아토피성 피부염과 같은 염증성 반응에 있어서 밀접한 상관성을 지니는 것으로 알려져 있다 (Soumelis et al. 2002).

MDC와 같은 케모카인이 연관되어 피부에서 생기는 염증성 질환인 아토피성 피부염은 가려움증 (pruritus)을 특징으로 하는 대표적인 염증성 피부 질환의 하나로, 알러지성 비염, 기관지 천식과 함께 대표적인 알러지성 질환이기도 하다 (Leung, Bieber 2003, Sturgill, Bernard 2004). 지금까지 아토피성 피부염의 발병 원인을 정확하게 규명하지는 못하고 있지만, 환경적인 요소와 더불어 유전적인 원인, 면역학적 원인 등 여러 가지 원인들이 복합적으로 관여하는 질환으로 알려져 있다 (Sandstrom, Faergemann 2004). 아토피성 피부염의 많은 비율을 차지하고 있는 외인성 피부염의 경우 Immunoglobulin E (IgE)와 관련된 기전에 의해 발생하는 경우가 많으며, 이러한 기전은 특정한 자극에 대한 즉각적인 반응보다는 T 세포가 관여하는 지연형 반응이 관계 있다는 보고가 있다. 또한 각질형성세포, T림프구 (T lymphocyte) 등의 다양한 세포와 MDC, TARC와 같은 여러 가지 인자들도 아토피 피부염의 발생에 관계가 있는 것으로 보고되어 있다 (Soumelis et al. 2002).

실험에 있어서 자극제로 사용된 IFN- $\gamma$ 는 세포의 활성을 조절하는 사이토카

인의 하나로 세포 사멸과 세포 주기의 조절, 항 바이러스 면역 등에 관여한다. 또한 각질세포가 형성되는 피부 외부층에 있어서는 염증 반응과 면역 반응에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 IFN- $\gamma$ 에 각질형성세포가 노출되면 signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) 신호 전달 기전이 활성화되어 염증 반응이 일어난다고 보고된 바 있다. 또한, 각질형성세포에 IFN- $\gamma$  자극이 주어졌을 때, STAT1 전사 인자뿐만 아니라 MAP kinase 또한 활성화 된다고 알려져 있다. 이러한 신호 전달 기전을 통해서 세포는 MDC/CCL22, TARC/CCL17과 같은 염증성 케모카인의 발현이 유도되며, 그로 인해 피부층에서 염증 방어기전이 형성되고 해당 부위로 단핵구와 T세포의 침투가 증가된다고 보고된 바 있다 (Madonna et al. 2008a, Ju et al. 2009).

STAT1은 IFN- $\gamma$  자극으로 인해 세포 내부에서 발현되는 janus kinase (JAK)/STAT 인산화 과정에서의 전사인자이며 (Han et al. 2002), 세포에 염증 반응을 일으키는 IFN- $\gamma$ 가 IFN- $\gamma$ -수용체 (IFNGR)와 결합하면 STAT1이 인산화되어 직접적인 신호전달체계를 시작하게 된다. STAT1 신호전달 과정은 먼저 JAK1/2가 인산화되고 활성화된 JAK1/2에 STAT1이 결합하여 다시 STAT1이 인산화 되는 과정을 거친다. 인산화된 STAT1 (phospho-STAT1; p-STAT1)은 2량체 (dimer)를 이루어 세포의 핵 내부로 이동하게 되고, 핵 내부에서 전사인자로서 MDC 등 여러 인자의 발현을 조절한다고 알려져 있다 (Ivashkiv, Hu 2004, Best et al. 2005).

Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)에는 p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK), stress-activated protein kinase (SAPK), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) 등 많은 종류의 kinase가 존재한다. 이러한 kinase는 각자의 신호전달 경로를 통해 인산화되며 그 결

과, 세포의 성장 및 분화와 더불어 생물학적인 반응에 넓게 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 IFN- $\gamma$  로 자극된 각질형성세포에 있어서 p38 MAP kinase와 NF- $\kappa$ B, ERK1/2의 활성화도 STAT1 신호전달 기전과 더불어 염증성 자극을 받았을 때가 자극을 받지 않았을 때에 비교했을 때 발현이 증가하는 경향이 있는 것으로 보고된 바 있다 (Pearson et al. 2001, Madonna et al. 2008b).

해조류에서 얻을 수 있는 물질로 해양 폴리페놀 계열의 phlorotannin 중 하나인 dieckol은 동일 계열의 물질인 eckol이 2량체를 이루어 형성된 화합물이다 (Park et al. 2013). 앞선 여러 연구들을 통해서 dieckol은 마우스에 있어서 reactive oxygen species (ROS)에 관여한 항산화 작용, 5 $\alpha$ -reductase 활성화에 관여한 발모 효과, 에탄올로 유발된 간 손상 마우스를 이용한 실험에서의 간 보호 효과 및 아세트산으로 유도된 실험 마우스에서의 혈관벽 보호 등에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며 (Lee et al. 2012, Kang et al. 2012a, Kang et al. 2012b, Kim et al. 2012), 이러한 연구 결과를 토대로 본 연구에서는 dieckol이 IFN- $\gamma$  로 유도된 염증 반응을 갖는 각질형성세포에서 증가하는 MDC의 형성 및 STAT1 인산화를 억제하는 효과가 있는지를 알아보려고 실험을 진행했다.

## II. 재료 및 실험방법

### 1. 시약 및 시료

Human adult low-calcium high-temperature (HaCaT) keratinocyte 세포는 제주대학교 의학전문대학원의 조문제 교수님으로부터 제공받아 사용했으며, eckol과 dieckol은 제주대학교 화학과 이남호 교수님으로부터 제공 받아 dimethyl sulfoxide (DMSO) 에 50mM의 농도로 희석하여 분주, 보관하며 사용했다. 자극제로 사용된 Human interferon- $\gamma$  (hIFN- $\gamma$ ; recombinant *E.coli*)는 Gibco (Grand Island, NY)에서, MDC ELISA duoset kit는 R&D system (St.Louis, MO, USA), anti-STAT1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa cruz, CA, USA), anti-phospho-STAT1 항체는 Cell signaling (Beverly, MA, USA),  $\beta$ -actin 항체는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입해 실험에 사용했다. 또한 STAT1 억제제로 사용된 epigallocatechin gallate (EGCG)와 ERK 억제제로 사용된 PD98059는 Sigma에서 구입해 사용했으며, 실험에 사용된 그 외의 시약들은 모두 1등급의 시약을 이용해 실험을 진행했다.

### 2. 세포 배양과 세포 생존능 평가

HaCaT 각질형성세포는 10%의 우태아 혈청 (fetal bovine serum; FBS,

Gibco)과 1%의 antibiotics (100X antibiotic antimycotic; Gibco)를 첨가한 RPMI 1640 1X (cellgro, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 농도가 유지되는 항온배양기에서 배양했다. 세포의 계대 배양은 세포가 배양접시의 면적에 약 80% 정도가 찼을 때 0.05%로 희석한 트립신 (trypsin-EDTA)을 이용해 세포를 배양접시에서 분리하고, 세포-트립신 혼합액을 RPMI 배지로 중화한 뒤, 원심 분리 (700rpm, 300초)하여 계대 배양했다.

세포 생존능은 WST assay를 통해서 평가했다. 세포 (1.0x10<sup>5</sup>cells/mL)를 96well plate에 접종한 뒤 항온배양기에서 18시간 동안 전배양 하고, IFN- $\gamma$  (10ng/mL), eckol과 dieckol을 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M의 농도로 serum free RPMI 배지에 처리했다. 시료를 처리한 상태로 24시간 동안 배양한 후, WST 용액을 각 well 당 5  $\mu$ L씩 첨가하여 1시간 배양한 뒤, VersaMax ELISA microplate reader (Molecular Devices, CA)로 450nm의 파장으로 처리된 값을 측정했다.

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

각질형성세포인 HaCaT keratinocytes 에서 eckol과 dieckol의 MDC 활성 억제체를 확인하기 위해, 계수된 세포 (2.0x10<sup>5</sup>cells/mL)를 96well plate에 접종하고 18시간 동안 전배양 했다. 전배양 후 배양액을 serum free RPMI 배지로 교체하고 IFN- $\gamma$  (10ng/mL)와 eckol, dieckol (12.5, 25, 50  $\mu$ M)을 배지에 희석해 처리한 뒤, 다시 24시간 동안 추가적으로 배양했다. 발생된 MDC를 얻고자, 각 well의 상층액을 취해 human MDC/CCL22 ELISA kit를 이용해 정량 했다.

표준곡선 (standard curve)은 human MDC standard를 이용하여 500 pg/mL에서부터 각각 1/2씩 순차적으로 희석 (serial dilution)했으며 MDC 생성량은 450nm의 파장에서 VersaMax ELISA microplate reader를 이용해 분석했다.

#### 4. Western blot analysis

계수된 각질형성세포 ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)를 60mm 배양접시에 분주하고 18시간 동안 전배양 했다. 배양 후, 각 배양접시에 dieckol을 2.5, 5, 10  $\mu$ M의 농도로 처리하고 30분 동안 배양했다. 배양 시간이 경과한 후 각각의 배양접시에 IFN- $\gamma$  (10ng/mL)를 처리하고 자극한 시간에 맞게 차가운 PBS로 2회 세척한 뒤 protein lysis buffer (basic lysis beffer 50mM, Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 1% Nonident P-40, 2mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM NaVO<sub>3</sub>, 10mM NaF, 1mM DTT, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25  $\mu$ g/mL leupeptin)를 30분 내외로 처리해 단백질을 분리했다. 분리한 단백질을 1.5mL 마이크로 튜브에 모아 원심분리 (15000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15분)한 후, 세포막 성분 등을 제거한 상층액을 얻었다. 단백질의 정량은 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 한 Bradford assay (bio-rad protein assay kit)를 통해 정량 했고, SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)를 이용해 동량의 단백질을 변성 분리한 후, 이를 PVDF membrane에 옮겼다. 단백질을 옮긴 membrane은 5% skim milk/TBST로 1시간 동안 실온에서 blocking한 후, 각각의 1차 항체 (pS-STAT1, pY-STAT1, p-JNK, p-ERK, p-p38, STAT1, JNK, ERK, p38; 1:1000,  $\beta$ -actin; 1:5000)로 4 $^{\circ}$ C의 온도에서 overnight 한 뒤 반응을 실시했

다. TBST를 이용해 1차 항체를 세척한 후, HRP-conjugated된 2차 항체 (1:5000)를 이용해 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 TBST로 2차 항체를 세척한 뒤, ECL 기질 (western blot detection kit)을 이용해 1분 간 반응시키고 X-ray film에 감광시켜 결과를 확인했다.

## 5. 레이저초점 주사현미경(Confocal laser scanning microscopy) 검사

6well plate 내부에 유리 커버글라스를 놓고 그 위에 각질형성세포 ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)를 접종하여 18시간 동안 전배양했다. 배양 후, 세포가 부착되어 있는 커버글라스가 포함된 각 well에 IFN- $\gamma$  (10ng/mL) 와 dieckol을 2.5, 5, 10  $\mu$ M의 농도로 20분 동안 처리한 뒤, 배지를 모두 제거했다. 세포가 부착된 커버글라스에 3.5% paraformaldehyde (PFA)를 넣어 30분 동안 세포를 고정시키고, 과량의 aldehyde 제거를 위해 0.1M glycine을 15분 동안 처리했다. 0.1% Triton X-100을 10분간 처리한 세포에 3% BSA/0.1% triton X-100/PBS 를 처리해 1시간 동안 반응시켰다. 세포와 항체의 반응을 위해서 1차 항체인 anti-STAT1을 1:200의 비율로 희석해 처리한 후 4°C에서 overnight 했다. PBST를 이용해 세척한 커버글라스에 2차로 DyLight488 conjugated donkey anti-rabbit secondary 항체를 1:300의 비율로 희석해 30분 동안 어두운 곳에서 반응시킨 뒤, 다시 PBST로 세척했다. 핵의 염색과 커버글라스의 고정을 위해 VECTASHIELD Mounting Media with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 처리하고, 매니큐어를 이용해 슬라이드 글라스에 커버글라스를 부착했다. FV500 confocal microscopy (Olympus, Tokyo, Japan)를 사용



해 형광 반응을 관찰했다.

## 6. 통계 처리

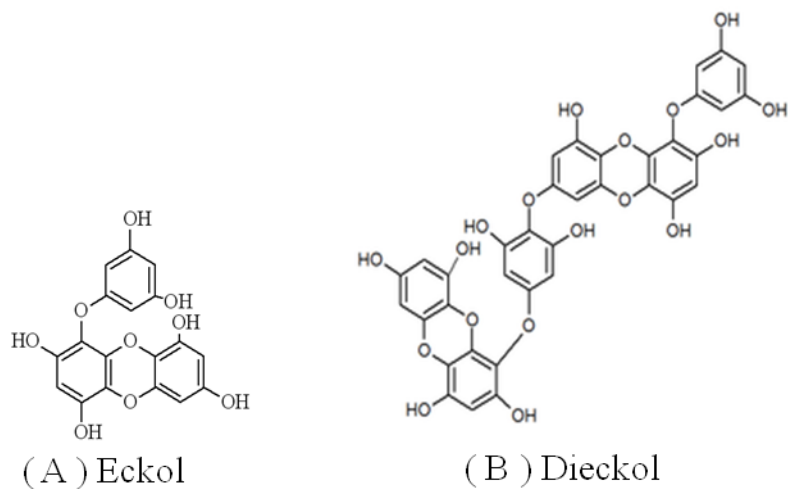
실험 결과는 각 실험을 통해 얻은 값을 이용해 나타냈으며, western blot analysis에서의 band density는 ImageJ 1.47n을 통해서 수치화 한 뒤 그래프로 나타냈다. 각 실험 결과 그래프의 통계처리는 Student' s *t-test* 분석을 통해서 검정했다.

### III. 결 과

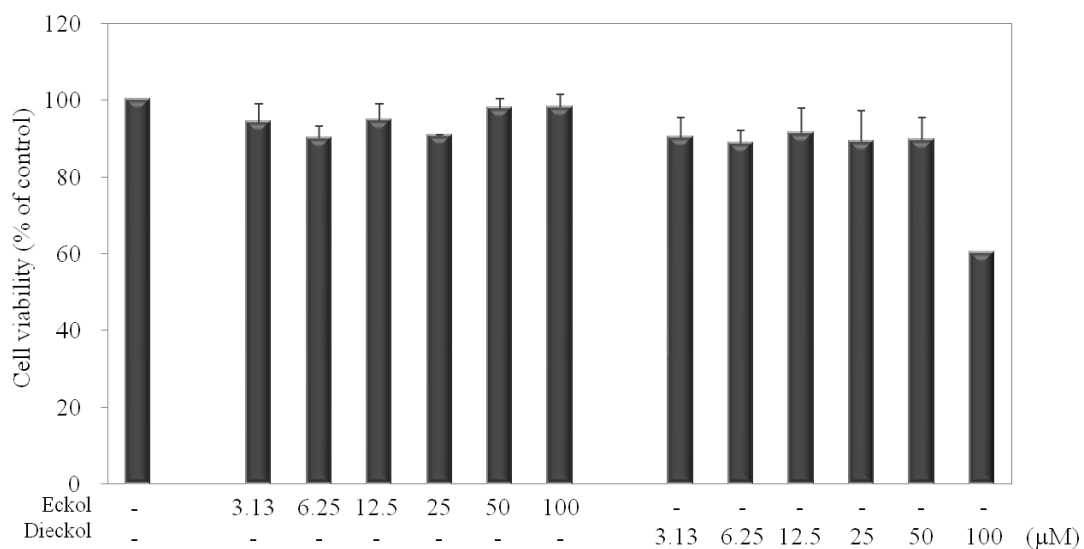
#### 1. 각질형성세포의 세포 생존능에 미치는 dieckol의 영향

Dieckol은 폴리페놀 계열의 phlorotannin 중 하나인 물질로, 동일 계열의 단량체 (monomer)인 eckol이 2량체를 이루고 있는 물질이다 (Park et al. 2013). Eckol은 phloroglucinol의 3량체를 이루고 있는 물질이며, 결국 dieckol은 phloroglucinol의 6량체로 이루어진 물질이다 (그림 1).

세포에 eckol과 dieckol이 어떠한 효과를 미치는지를 확인하는 실험에 앞서, HaCaT keratinocyte에 두 물질을 처리했을 때 세포 생존에 영향을 주는지를 확인하기 위해 세포 생존능 평가 방법의 하나인 WST assay를 수행했다. 세포에 IFN- $\gamma$  (10ng/mL)와 eckol, dieckol을 농도 별로 희석하여 처리한 뒤 24시간 동안 배양하고 WST 시약을 통해 세포의 독성을 측정했다. 그 결과, 자극제와 시료를 처리하지 않은 대조군의 세포 생존능력을 100%로 보았을 때 dieckol을 100  $\mu$ M로 처리한 군을 제외한 나머지 처리군에서는 세포에 대해 독성을 나타내지 않는 것을 그림 2를 통해 확인할 수 있다.



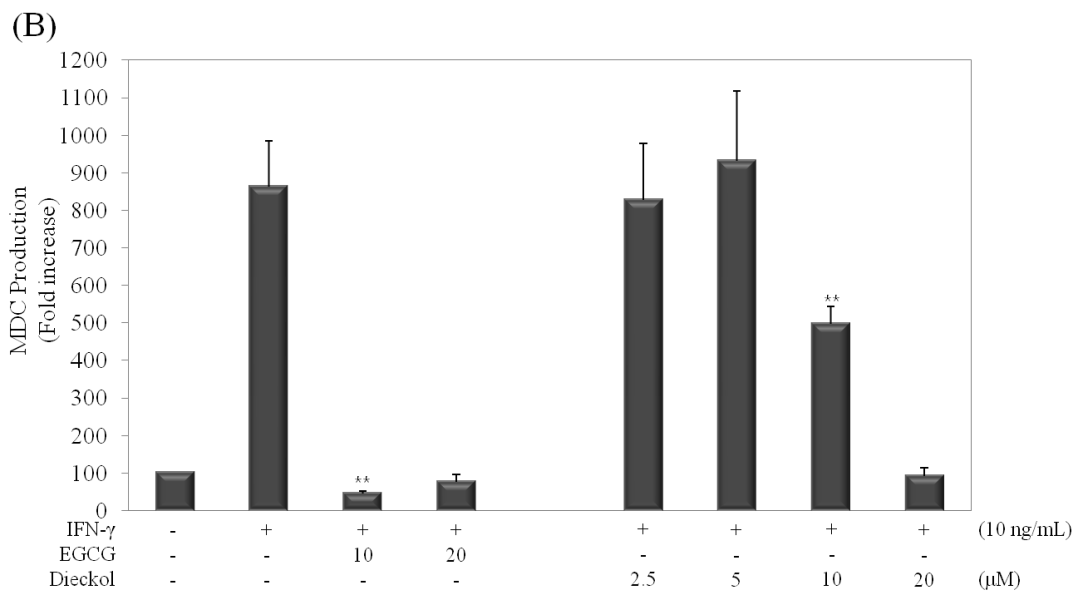
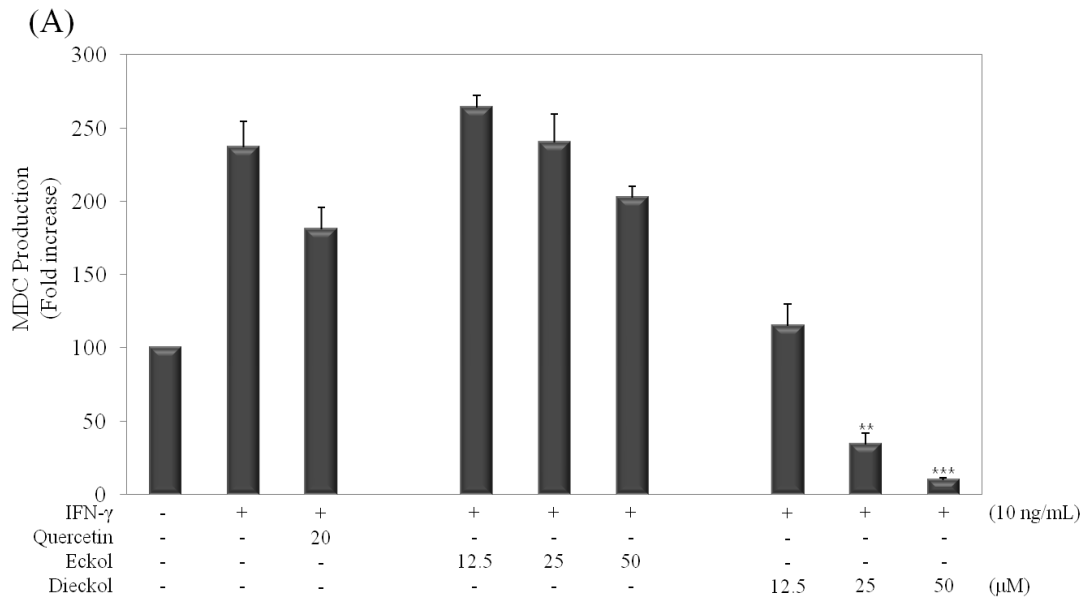
**Figure 1. Chemical structure of eckol and dieckol**



**Figure 2. Effects of eckol and dieckol on the cell viability in HaCaT human keratinocytes.** Cells were pre-incubated for 18hrs and treated with indicated concentrations of eckol and dieckol (3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) for 24hrs, and cell viability was determined. The cell viability was confirmed by WST assay.

## 2. MDC의 생성에 대한 dieckol의 억제 효과

각질형성세포가 IFN- $\gamma$ 로 유도한 염증성 자극을 받으면 생성되는 케모카인의 한 종류인 MDC의 생성에 대해서 eckol과 dieckol이 어떠한 효과를 나타내는지 알아보기 위해 ELISA assay를 수행했다. HaCaT 세포에서 IFN- $\gamma$ 의 자극에 의해 MDC를 포함한 다양한 케모카인이 생성되는 것이 알려져 있고 (Qi et al. 2009), 이에 근거해 IFN- $\gamma$  (10ng/mL)로 염증성 자극을 준 후 MDC의 생성을 유도했다. 자극을 받은 세포에 eckol과 dieckol을 여러 농도 별로 처리한 결과, eckol은 농도에 상관없이 MDC 생성에 크게 영향을 주지 않은 반면, dieckol은 높은 농도일수록 MDC를 억제하는 경향을 보였다 (그림 3-A). Dieckol만을 이용해 다시 MDC의 생성에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 dieckol의 농도를 앞선 결과보다 낮게 설정한 뒤 실험했다. 결과를 보면 20  $\mu$ M과 10  $\mu$ M에서는 자극을 받은 세포에서 생성된 MDC의 생성량을 100%로 보았을 때에 비교했을 때 각각 약 90%, 40% 정도 MDC의 생성을 억제하는 효과를 보였다. 하지만 5  $\mu$ M과 2.5  $\mu$ M로 dieckol을 처리한 군에서는 자극제 처리군에 비해서 MDC의 생성을 억제하는 효과가 크게 나타나지 않는 것을 그림 3-B를 통해서 알 수 있다.

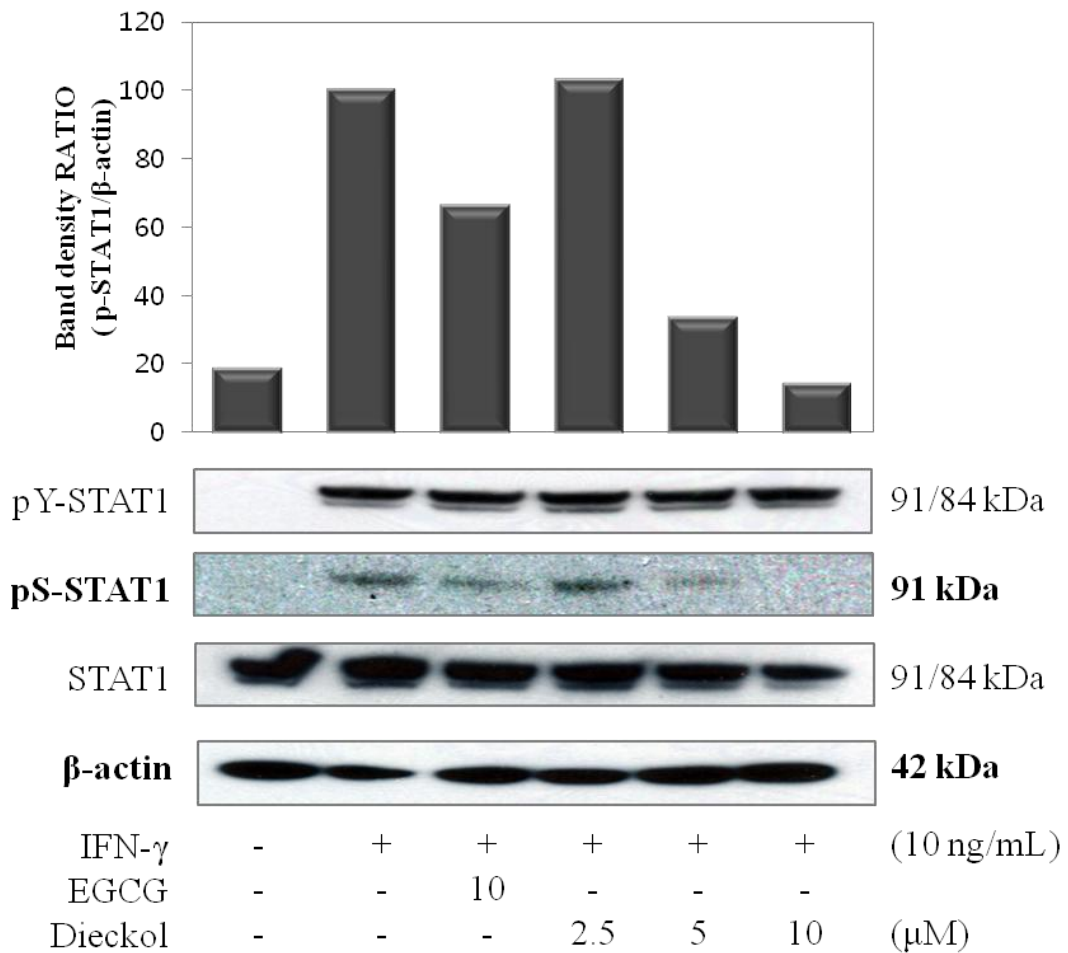


**Figure 3. Effects of eckol and dieckol on the protein production of MDC in HaCaT human keratinocytes.** (A) Cells ( $2.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18hrs, and MDC production was determined from the culture supernatant of cells stimulated by IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) and treated with quercetin (positive control; MDC), eckol and dieckol for 24hrs. (B) Cells ( $2.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18hrs, and MDC production was determined from the culture supernatant of cells stimulated by IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) and treated

with EGCG (positive control; STAT1) and dieckol for 24hrs. MDC production was measured by ELISA. The measurements of MDC were done in triplicate. Error bars indicate  $\pm$  S.D. \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001.

### 3. Dieckol이 STAT 신호전달 과정에 미치는 영향

Interferon 계열의 자극제를 이용해 세포에 자극을 주면 여러 경로의 STAT 신호전달 체계를 활성화 시키는 것이 알려져 있다 (Rauch, Muller & Decker 2013). 또한 STAT1이 인산화되면 그로 인해 MDC가 생성된다는 연구 결과도 보고되어 있다 (Ivashkiv, Hu 2004, Best et al. 2005). 이를 토대로 dieckol이 STAT1 신호전달 경로에 관여해 MDC를 억제하는지를 알아보하고자 western blot을 이용해 STAT1의 인산화에 dieckol이 미치는 영향을 확인해보았다. IFN- $\gamma$ 로 자극했을 때 인산화되는 STAT1의 단백질 발현량을 100%로 보았을 때, dieckol을 처리한 군에서는 처리 농도가 높을수록 억제하는 정도도 높은 것을 확인할 수 있었다. Dieckol을 10  $\mu$ M로 처리한 경우 약 85%의 감소 경향을 나타내었으며 5  $\mu$ M로 처리한 경우에는 자극제로 인한 발현량에 비해서 약 65% 정도의 감소 경향을 나타낸 것을 확인할 수 있다. 하지만 dieckol을 2.5  $\mu$ M로 처리한 경우에는 인산화된 pS-STAT1의 인산화 정도가 자극제 처리군과 크게 다르지 않은 것을 그림 4를 통해서 볼 수 있다.



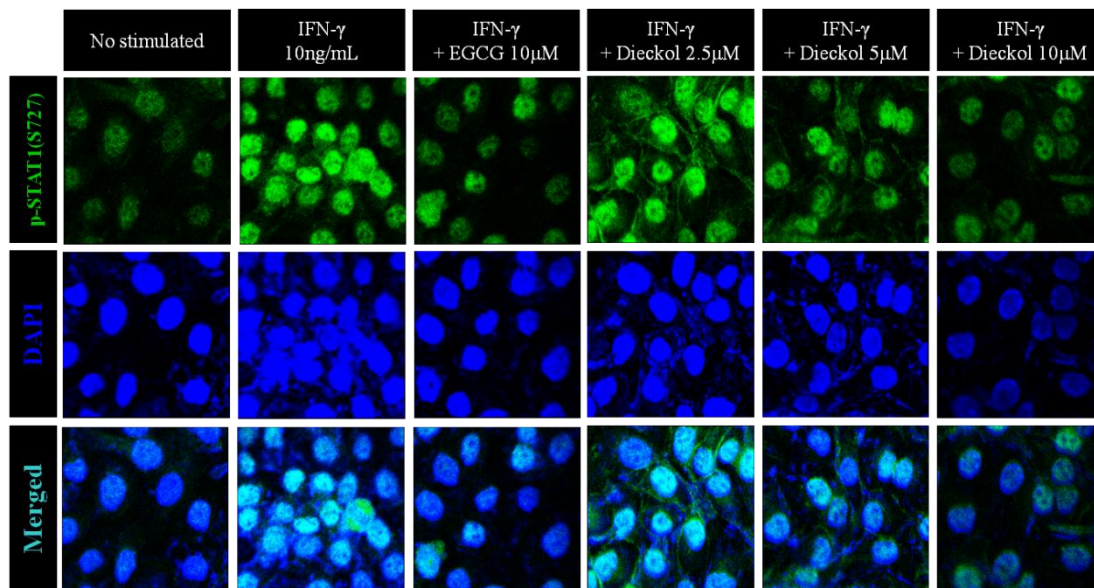
**Figure 4. Phosphorylation of STAT1 in interferon- $\gamma$ -stimulated HaCaT human keratinocytes.** Cells ( $5.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-treated with epigallocatechin gallate (EGCG; 10  $\mu$ M) and dieckol (2.5, 5, 10  $\mu$ M) 30mins, and phosphorylation of STAT1 was determined in cells stimulated by IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) for 15mins. The phosphorylation of STAT1, level of STAT1, and  $\beta$ -actin proteins were determined by western blotting of whole cell lysates with the indicated antibodies.



#### 4. HaCaT 각질형성세포에서 STAT1의 핵 내부로의 이동에 대한 dieckol의 효과

신호전달에 있어서 STAT은 신호의 핵-세포질 간의 수송에 관여하는 인자로, 비활성화 상태의 STAT1은 세포질에서 활성을 띠지 않는 전구물질 형태로 존재한다. 자극을 통해서 활성화된 STAT1은 티로신 (tyrosine)기의 인산화 결과로 인해 세포질에서 핵 내부로 이동하며 핵 내부에 존재하는 DNA에 결합해 신호를 전달하게 된다. 이러한 일련의 과정을 통해서 STAT1과 DNA의 결합 증가로 세포의 핵 내부에 STAT1 인자가 축적되면 염증과 관련되어 IFN-stimulated genes (ISGs) 또는 ISG factor 3 (ISGF3)와 같은 여러 유전자의 발현이 유도된다 (Brierley, Fish 2005, Beurel, Jope 2008).

Confocal 형광현미경을 통해 HaCaT 세포의 STAT1 신호전달 경로에 dieckol이 어떠한 억제효과를 보이는지 살펴보았다. IFN- $\gamma$ 로 자극을 받은 세포에서는 인산화된 STAT1이 DAPI로 염색된 핵의 내부로 다량 이동한 것을 볼 수 있는데, 자극제와 함께 dieckol을 10  $\mu$ M로 처리한 군에서는 앞선 western blot 실험의 결과와 마찬가지로 핵 내부로 이동하는 pS-STAT1을 억제하는 경향을 나타냈고, 5  $\mu$ M로 처리한 군에서도 인산화된 STAT1의 핵 내부로의 이동이 일부 억제되는 것을 확인할 수 있다. 하지만 그림 4의 결과에서 확인한 것과 같이 2.5  $\mu$ M의 dieckol을 처리한 군에서는 인산화된 STAT1의 핵 내로의 이동이 크게 억제되지 않는 경향을 그림 5의 형광 현미경 상에서 확인할 수 있다.

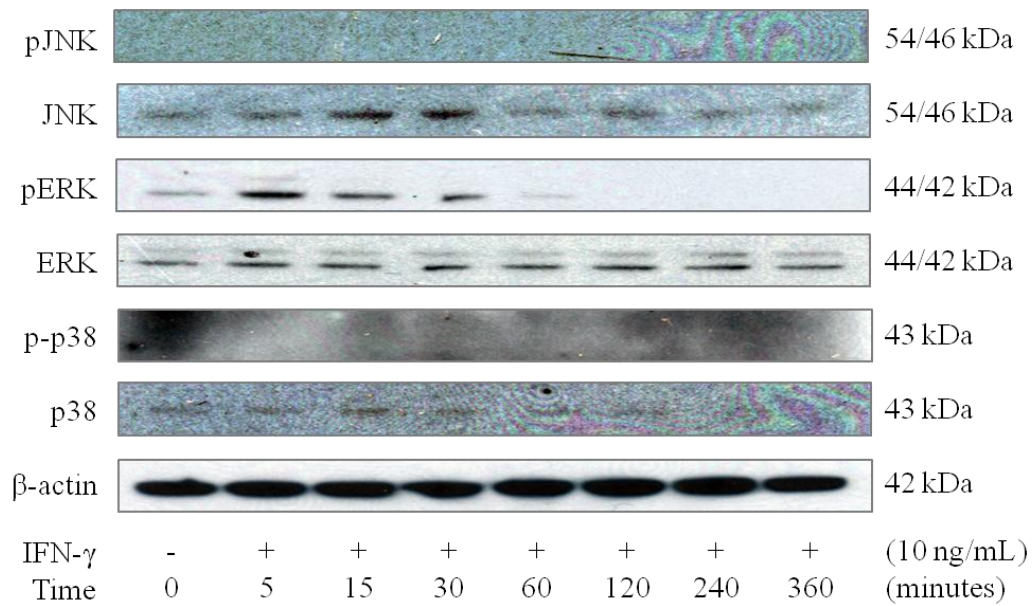


**Figure 5. Effect of dieckol on the translocation of STAT1 phosphorylation in interferon- $\gamma$ -induced HaCaT human keratinocytes.** Cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL) were pre-incubated for 18 hrs. Then cells were pre-treated with EGCG (10  $\mu$ M), dieckol (2.5, 5, 10  $\mu$ M) and were stimulated with IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) for 20mins. Immunofluorescence stain of phospho-STAT1 was stained with DyLight488-conjugated 2<sup>nd</sup> antibody and the fluorescence was identified using confocal microscopy (FV500, OLYMPUS). The scan images were acquired at constant PMT, gain, offset, magnification (40x oil immersion objective with 1.5x zoom) and resolution.

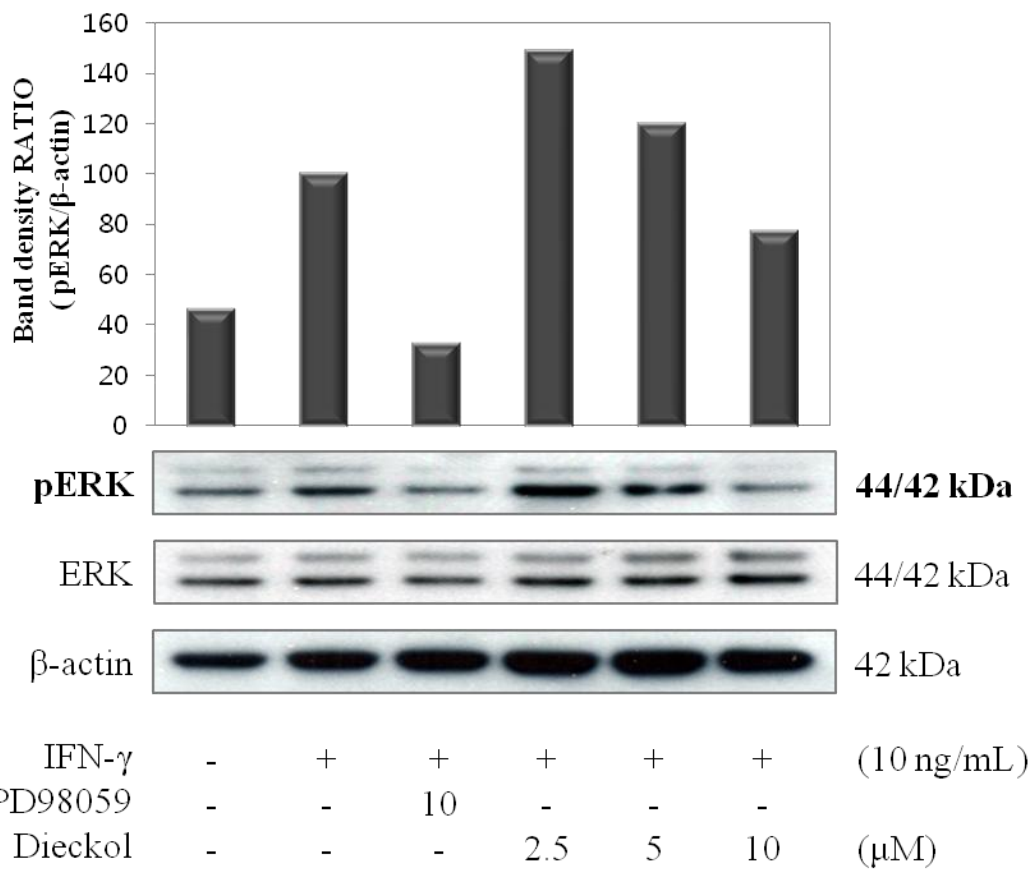
## 5. 각질형성세포에서의 MAP kinase 신호전달기전에 대한 dieckol의 효과

각질형성세포가 자극을 받았을 때, STAT1 신호전달 경로 이외에 ERK 인산화 경로를 통해서도 염증 반응에 영향을 준다는 것이 알려져 있으며 (Madonna et al. 2008b), 해당 경로에 dieckol이 어떠한 효과를 보이는지를 실험을 통해 알아보았다. 먼저 JNK, ERK, p38 MAP kinase 경로 중 어떤 경로가 HaCaT 세포에 유효한지를 western blot을 이용해 시간대 별 인산화 정도를 알아보았다. 자극을 받기 시작한 시간인 0분부터 자극제를 처리하고 360분까지의 각 시간대에서 발현되는 kinase의 인산화 정도를 측정된 결과, phosphor-JNK와 phospho-p38은 발현되지 않은 반면에, phosphor-ERK (pERK)의 경우 자극 후 5분의 시간대에서 가장 큰 인산화 정도를 보였다 (그림 6).

위의 실험을 통해서 STAT1과 더불어 ERK가 IFN- $\gamma$  자극에 의해서 인산화 되는 것을 확인했고, 따라서 STAT1의 인산화에 억제효과를 보였던 dieckol이 ERK의 인산화에도 억제효과를 보이는지를 western blot을 통해서 확인했다. 자극제를 처리하지 않은 군과 IFN- $\gamma$ 로 자극한 군, ERK 억제제로 알려진 PD98059를 10  $\mu$ M로 처리한 군, dieckol을 각 농도 별로 처리한 군으로 나누어 ERK의 인산화 정도의 차이를 알아보았다. ERK 억제제를 처리한 군의 경우 10  $\mu$ M로 처리한 군에서 자극제 처리군에 비교했을 때 억제효과를 보이는 것을 알 수 있었으며, Dieckol을 처리한 군의 경우, 상대적으로 고농도 (10  $\mu$ M)로 처리했을 때가 저농도 (2.5  $\mu$ M)로 처리한 군에 비교했을 때 ERK의 인산화를 억제하는 경향을 나타내는 것을 그림 7을 통해서 확인할 수 있다.



**Figure 6. Phosphorylation of MAP kinases in interferon- $\gamma$ -stimulated HaCaT human keratinocytes.** Cells ( $5.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18hrs. And cells were stimulated by IFN- $\gamma$  (10ng/mL) for indicated times (0~360 mins). The phosphorylation of JNK, ERK, p38 MAPKs and  $\beta$ -actin proteins were determined by western blotting of whole cell lysates with the indicated antibodies.

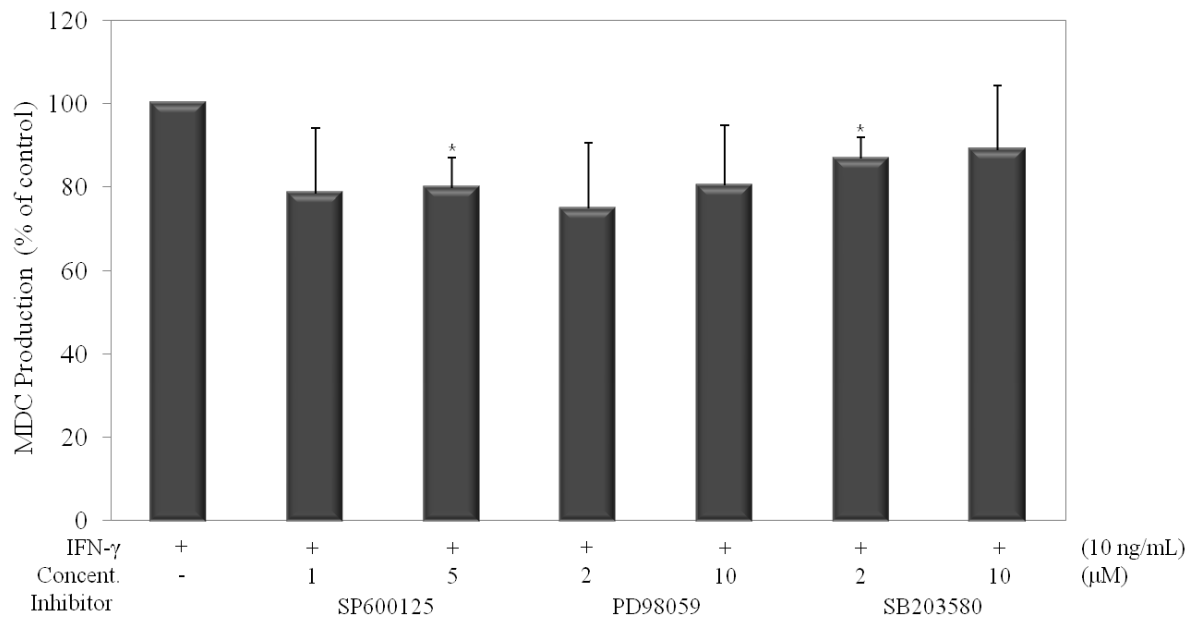


**Figure 7. Phosphorylation of ERK in interferon- $\gamma$ -stimulated HaCaT human keratinocytes.** Cells ( $5.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-treated with PD98059 (ERK inhibitor; 10  $\mu$ M) and dieckol (2.5, 5, 10  $\mu$ M) for 2hrs, and phosphorylation of ERK was determined in cells stimulated by IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) for 5mins. The phosphorylation of ERK, level of ERK, and  $\beta$ -actin proteins were determined by western blotting of whole cell lysates with the indicated antibodies.

## 6. MDC 생성량에 미치는 ERK 억제제의 영향

시간대 별 MAP kinase의 인산화 정도 확인을 통해서 각질형성세포에 IFN- $\gamma$ 로 자극을 주었을 때 ERK 기전에서 인산화가 일어나는 것을 확인했다. 또한 dieckol이 ERK의 인산화를 억제하는 경향을 나타내는 것도 그림 7을 통해 확인할 수 있었다. 그림 7의 western blot 결과에서 ERK의 인산화를 억제하는데 사용된 PD98059가 dieckol과 마찬가지로 MDC의 생성에도 영향을 미치는지를 알아보기 위해 ELISA assay를 수행했다.

세포 생존에 영향을 미치지 않는 농도를 각 억제제에 따라 2가지씩 설정하고, 그 차이를 비교했다. 세포 생존능 평가에서 낮은 농도에서도 생존능에 영향을 미쳤던 JNK 억제제인 SP60025는 1  $\mu$ M과 5  $\mu$ M로, ERK 억제제인 PD98059와 p38 억제제인 SB203580은 각각 2  $\mu$ M과 10  $\mu$ M의 농도로 설정해 MDC 생성에 어떤 영향을 주는지 알아보았는데, 염증성 자극을 받은 세포에서 생성되는 MDC 생성량을 100%로 보았을 때, SB203580은 큰 억제효과를 나타내지 않았으며, SP600125와 PD98059는 미약한 억제효과를 나타낸 것을 알 수 있다 (그림 8). 이를 통해 dieckol의 ERK 인산화 억제는 MDC의 생성량의 조절에는 직접적인 영향을 주지 않는 것을 알 수 있다.



**Figure 8. Effects of kinase inhibitors on the protein production of MDC in HaCaT human keratinocytes.** Cells ( $2.0 \times 10^5$  cells/mL) were pre-incubated for 18hrs, and MDC production was determined from the culture supernatant of cells stimulated by IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) and treated with kinase inhibitors (SP600125; JNK inhibitor, PD98059; ERK inhibitor, SB203580; p38 inhibitor) for 24hrs. MDC production was measured by ELISA. The measurements of MDC were done in triplicate. Error bars indicate  $\pm$  S.D. \* $P < 0.05$ .

## IV. 고 찰

앞서 제시한 여러 실험 연구 결과를 토대로 본 연구에서는 각질형성세포인 HaCaT keratinocyte에 IFN- $\gamma$ 로 자극을 주었을 때, 피부 염증 반응에서 생성되는 케모카인 중 하나인 MDC가 생성되는 것을 확인하고 이를 dieckol이 억제할 수 있는지, 또한 어떠한 경로를 통해 영향을 미치는지에 대해 조사했다.

각질형성세포에서 자극을 통해 생성되는 케모카인 중 하나인 MDC의 생성에 eckol과 dieckol이 어떠한 활성 효과를 나타내는지 ELISA assay를 통해 정량화하여 확인했다. IFN- $\gamma$ 로 염증성 자극을 받아 생성된 MDC의 생성량을 100%로 설정했을 때, eckol의 경우에는 농도에 관계없이 MDC 생성량에 크게 영향을 주지 않는 것을 확인했고, dieckol은 높은 농도일수록 MDC 생성을 억제하는 경향이 큰 것을 확인해볼 수 있었다. MDC 생성 억제에 크게 효과를 보이지 않은 eckol을 제외하고 dieckol만으로 농도를 재설정 한 뒤 실험한 결과에서도 20  $\mu$ M의 농도로 dieckol을 처리한 군에서 90% 정도의 MDC 억제 효과를 나타냈다. 또한 10  $\mu$ M의 농도로 dieckol을 처리한 군에서는 약 40% 정도의 MDC 생성을 억제하는 효과를 보였다. 이를 통해서 eckol과 dieckol 중 MDC의 생성을 억제하는데 효과를 보이는 것이 dieckol임을 확인했고, MDC 생성을 억제하는 양상은 고농도에서 저농도로의 농도 의존적인 경향을 나타내는 것을 알 수 있었다. Eckol에 비교했을 때 dieckol이 MDC 생성을 더 억제하는 것은 화학 구조에서 수산기 (hydroxyl group)에 결합한 수소이온의 수량 차이에 인한 영향일 것으로 생각된다. Kim.T.H. 등의 연구에 따르면, Eckol에 있는 수산기에는 R 기가 수소이온으로 채워져 있는데, eckol이 결합해서 파생된 화합물 중 R 기



에 메틸 (Me)이 결합된 Me-dieckol과 아세틸 (Ac)이 결합된 Ac-dieckol에 비교했을 때, R 기에 수소이온이 결합된 dieckol이 혈관벽 보호 효과가 높다는 결과가 있다. 이를 통해서 dieckol이 eckol보다 MDC를 억제하는 경향이 있다는 것을 생각해 볼 수 있다 (Kim et al. 2012).

알려진 바와 같이, MDC의 생성에 있어서 STAT1 신호전달 체계가 관련이 있음을 근거로 하여 (Ivashkiv, Hu 2004, Best et al. 2005) STAT1의 인산화 정도에 dieckol이 어떤 영향을 주는지를 western blot을 통해 알아보았다. 세포에 dieckol을 전처리 하고 IFN- $\gamma$ 로 자극하여 얻은 단백질을 이용해 pSTAT1에 대한 dieckol의 억제 효과를 확인했다. IFN- $\gamma$ 로 자극 받은 세포에서 생성된 phospho-STAT1은 티로신 (Tyr701; Y)형태와 세린 (Ser727; S)형태로 다시 나뉘게 되는데, 이 중 dieckol은 pS-STAT1을 억제하는 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 세포질에서 일어나는 인산화에 관여하는 티로신 부분의 인산화보다는 핵으로의 인산화에 영향을 주는 세린 부분의 인산화에 dieckol이 영향을 주는 것으로 생각할 수 있다. 이를 통해서 dieckol이 MDC 생성을 억제하는 것은 STAT1 신호전달 경로 중 세린기의 인산화를 억제해서 영향을 주는 것이라고 볼 수 있다.

인산화된 STAT1이 세포질에서 핵 내부로 이동해 신호를 전달하고 유전자 발현을 유도함에 따라, 레이저초점 주사현미경 (Confocal laser scanning microscopy)을 이용해 핵 내부로 이동하는 인산화된 STAT1에 dieckol이 미치는 영향을 확인했다. Western blot을 통해 확인한 STAT1의 인산화 억제 경향과 마찬가지로 세포질에서 핵 내부로의 이동에 있어서도 dieckol이 농도 의존적인 억제 효과를 나타낸 것을 확인할 수 있었다. IFN- $\gamma$ 로 자극 받은 HaCaT 세포의 핵 내부에서는 인산화된 세린기의 STAT1이 다량으로 존재하는 반면,

dieckol이 높은 농도로 처리된 군에서는 핵 내부에 존재하는 pS-STAT1의 양이 농도에 의존적인 경향을 보이며 감소한 것을 볼 수 있었다. 이 결과를 통해서 dieckol이 세포질에서의 pY-STAT1보다는 핵 내부로 이동해 인산화되는 pS-STAT1에 영향을 주어 MDC 생성에도 영향을 미치는 것이라고 생각해 볼 수 있다.

각질형성세포에서 STAT 신호전달 경로 이외에도 p38 MAP kinase 또는 NF- $\kappa$ B 경로를 통해 염증 반응이 일어나고, IFN- $\gamma$ 로 자극된 HaCaT 세포에서도 이러한 경로를 통해 MDC가 생성된다는 연구 (Pearson et al. 2001, Madonna et al. 2008b, Qi et al. 2009)를 토대로, 실험에 사용된 HaCaT 세포에서 어떠한 MAP kinase가 활성을 나타내는지 시간대 별로 확인해보았다. JNK와 ERK, p38 MAP kinase 중 HaCaT 세포에서는 ERK 경로가 다른 두 경로보다 활성화되어 있음을 인산화 정도의 차이를 통해 확인할 수 있었다. Dieckol이 STAT1의 인산화에 영향을 준 것과 같이 ERK의 인산화에도 영향을 미치는지 western blot을 이용해 확인했다. 앞서 실험한 STAT1의 인산화 억제 효과와 유사한 실험 결과를 관찰할 수 있었다. 자극제만 처리한 군에서는 자극을 받지 않은 세포에 비교했을 때 인산화된 ERK (pERK)의 발현량이 증가했으며, ERK 억제제 (PD98059)를 처리한 군에서는 자극제 단독 처리군에 비교했을 때 pERK의 발현량이 감소했음을 확인할 수 있었다. 또한 dieckol을 높은 농도 (10  $\mu$ M)로 처리한 군에서는 STAT1의 실험 결과에서와 같이 자극제 처리군 보다 pERK 발현량이 감소했으며, 5  $\mu$ M과 2.5  $\mu$ M을 처리한 군에서는 그 효과가 점차적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해서 dieckol이 IFN- $\gamma$ 로 자극된 HaCaT 세포에서 STAT1의 인산화 뿐만 아니라 인산화되는 ERK 경로에도 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. ERK 기전이 억제되는 경우에 그에 따라

MDC의 생성도 억제되는지를 알아보려고 ERK 억제제인 PD98059를 포함한 MAP kinase 억제제를 농도 별로 처리하여 생성되는 MDC의 억제 정도를 알아보았다. 두 가지 농도로 ERK 억제제를 처리한 군에서 STAT1 억제제나 dieckol을 처리한 군보다는 적은 정도였으나 약 20% 정도의 MDC 생성을 억제하는 효과를 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해서 dieckol은 STAT1과 ERK의 인산화를 억제하는 경향을 보이지만, ERK보다는 STAT1 경로를 통해서 MDC 생성을 억제하며, MAP kinase 경로 중에서는 ERK 기전이 일부 관여하고 있다고 생각해볼 수 있다.

일련의 실험 결과를 요약해보면, eckol과 dieckol 중 dieckol은 HaCaT 세포에 있어서 아토피성 피부염과 관련된 인자인 MDC의 생성을 억제하는 효과를 나타낸 것을 알 수 있으며, 이는 STAT 신호전달 경로 중 STAT1의 인산화 억제를 통해서라고 생각할 수 있다. Confocal 형광현미경으로 관찰한 HaCaT 세포에서의 인산화된 세린기의 STAT1은 세포질에서 핵 내부로 이동하여 작용하게 되는데, 여기에 dieckol이 관여해 핵 내부로 이동하는 pS-STAT1을 감소시키는 것을 확인해볼 수 있었다. 또한 dieckol은 STAT1 경로뿐만 아니라 ERK의 인산화에도 영향을 주어 억제하는 양상을 나타내기는 했으나, 세린기 STAT1의 인산화를 통해 MDC를 억제하는 양상에 비교했을 때, ERK 경로를 통해서 MDC의 생성을 크게 억제하는 효과를 보이지는 않는 것으로 생각해볼 수 있다. 본 연구를 통해서 dieckol이 IFN- $\gamma$ 로 자극된 HaCaT 세포에서 염증 반응의 지표 중 하나인 MDC를 억제하는 것을 확인했으며, dieckol이 아토피성 피부염을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 있어서 유용한 물질로 사용될 수 있을 것임을 알 수 있다.

## V. 참고 문헌

- Baumer, W., Seegers, U., Braun, M., Tschernig, T. & Kietzmann, M. 2004, "TARC and RANTES, but not CTACK, are induced in two models of allergic contact dermatitis. Effects of cilomilast and diflorasone diacetate on T-cell-attracting chemokines", *The British journal of dermatology*, vol. 151, no. 4, pp. 823-830.
- Best, S.M., Morris, K.L., Shannon, J.G., Robertson, S.J., Mitzel, D.N., Park, G.S., Boer, E., Wolfenbarger, J.B. & Bloom, M.E. 2005, "Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist", *Journal of virology*, vol. 79, no. 20, pp. 12828-12839.
- Beurel, E. & Joep, R.S. 2008, "Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 32, pp. 21934-21944.
- Brierley, M.M. & Fish, E.N. 2005, "Stats: multifaceted regulators of transcription", *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, vol. 25, no. 12, pp. 733-744.
- Han, S.K., Song, J.Y., Yun, Y.S. & Yi, S.Y. 2002, "Gamma irradiation-reduced IFN-gamma expression, STAT1 signals, and cell-mediated immunity", *Journal of biochemistry and molecular biology*, vol. 35, no. 6, pp. 583-589.
- Ivashkiv, L.B. & Hu, X. 2004, "Signaling by STATs", *Arthritis research & therapy*, vol. 6, no. 4, pp. 159-168.
- Jahnz-Rozyk, K., Targowski, T., Paluchowska, E., Owczarek, W. & Kucharczyk, A. 2005, "Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis", *Allergy*, vol. 60, no. 5, pp. 685-688.
- Jakubzick, C., Wen, H., Matsukawa, A., Keller, M., Kunkel, S.L. & Hogaboam, C.M. 2004,

- "Role of CCR4 ligands, CCL17 and CCL22, during *Schistosoma mansoni* egg-induced pulmonary granuloma formation in mice", *The American journal of pathology*, vol. 165, no. 4, pp. 1211-1221.
- Ju, S.M., Song, H.Y., Lee, S.J., Seo, W.Y., Sin, D.H., Goh, A.R., Kang, Y.H., Kang, I.J., Won, M.H., Yi, J.S., Kwon, D.J., Bae, Y.S., Choi, S.Y. & Park, J. 2009, "Suppression of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose via blockade of NF-kappaB and STAT1 activation in the HaCaT cells", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 387, no. 1, pp. 115-120.
- Kang, J.I., Kim, S.C., Kim, M.K., Boo, H.J., Jeon, Y.J., Koh, Y.S., Yoo, E.S., Kang, S.M. & Kang, H.K. 2012a, "Effect of Dieckol, a Component of *Ecklonia cava*, on the Promotion of Hair Growth", *International journal of molecular sciences*, vol. 13, no. 5, pp. 6407-6423.
- Kang, M.C., Ahn, G., Yang, X., Kim, K.N., Kang, S.M., Lee, S.H., Ko, S.C., Ko, J.Y., Kim, D., Kim, Y.T., Jee, Y., Park, S.J. & Jeon, Y.J. 2012b, "Hepatoprotective effects of dieckol-rich phlorotannins from *Ecklonia cava*, a brown seaweed, against ethanol induced liver damage in BALB/c mice", *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, vol. 50, no. 6, pp. 1986-1991.
- Kim, T.H., Lee, T., Ku, S.K. & Bae, J.S. 2012, "Vascular barrier protective effects of eckol and its derivatives", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 22, no. 11, pp. 3710-3712.
- Lee, S.H., Park, M.H., Kang, S.M., Ko, S.C., Kang, M.C., Cho, S., Park, P.J., Jeon, B.T., Kim, S.K., Han, J.S. & Jeon, Y.J. 2012, "Dieckol isolated from *Ecklonia cava* protects against high-glucose induced damage to rat insulinoma cells by reducing oxidative stress and apoptosis", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 76, no. 8, pp.

1445-1451.

Leung, D.Y. & Bieber, T. 2003, "Atopic dermatitis", *Lancet*, vol. 361, no. 9352, pp. 151-160.

Madonna, S., Scarponi, C., De Pita, O. & Albanesi, C. 2008a, "Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IFN-gamma inflammatory signaling in human keratinocytes by sustaining ERK1/2 activation", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 22, no. 9, pp. 3287-3297.

Madonna, S., Scarponi, C., De Pita, O. & Albanesi, C. 2008b, "Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IFN-gamma inflammatory signaling in human keratinocytes by sustaining ERK1/2 activation", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 22, no. 9, pp. 3287-3297.

Maeda, S., Fujiwara, S., Omori, K., Kawano, K., Kurata, K., Masuda, K., Ohno, K. & Tsujimoto, H. 2002, "Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis", *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 88, no. 1-2, pp. 79-87.

Park, J.Y., Kim, J.H., Kwon, J.M., Kwon, H.J., Jeong, H.J., Kim, Y.M., Kim, D., Lee, W.S. & Ryu, Y.B. 2013, "Dieckol, a SARS-CoV 3CL(pro) inhibitor, isolated from the edible brown algae *Ecklonia cava*", *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 21, no. 13, pp. 3730-3737.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M.H. 2001, "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions", *Endocrine reviews*, vol. 22, no. 2, pp. 153-183.

Qi, X.F., Kim, D.H., Yoon, Y.S., Li, J.H., Jin, D., Teng, Y.C., Kim, S.K. & Lee, K.J. 2009, "Fluvastatin inhibits expression of the chemokine MDC/CCL22 induced by interferon-gamma in HaCaT cells, a human keratinocyte cell line", *British journal of pharmacology*, vol. 157, no. 8, pp. 1441-1450.

Rauch, I., Muller, M. & Decker, T. 2013, "The regulation of inflammation by interferons and

- their STATs", *Jak-Stat*, vol. 2, no. 1, pp. e23820.
- Sandstrom, M.H. & Faergemann, J. 2004, "Prognosis and prognostic factors in adult patients with atopic dermatitis: a long-term follow-up questionnaire study", *The British journal of dermatology*, vol. 150, no. 1, pp. 103-110.
- Shimada, Y., Takehara, K. & Sato, S. 2004, "Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis", *Journal of dermatological science*, vol. 34, no. 3, pp. 201-208.
- Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., de Waal-Malefyt Rd, R., Bazan, F., Kastelein, R.A. & Liu, Y.J. 2002, "Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP", *Nature immunology*, vol. 3, no. 7, pp. 673-680.
- Sturgill, S. & Bernard, L.A. 2004, "Atopic dermatitis update", *Current opinion in pediatrics*, vol. 16, no. 4, pp. 396-401.
- Yoshie, O., Imai, T. & Nomiyama, H. 2001, "Chemokines in immunity", *Advances in Immunology*, vol. 78, pp. 57-110.
- Zlotnik, A. & Yoshie, O. 2000, "Chemokines: a new classification system and their role in immunity", *Immunity*, vol. 12, no. 2, pp. 121-127.
- 이일주 2002, *알레르기성 접촉피부염과 자극성 접촉피부염에서 발현되는 표피내 사이토카인*, 연세대학교 대학원.

## 감사의 글

거친 풍랑 없는 단조로운 생활 속에서 겁도 없이 시작했던 대학원 과정이 작게나마 결실을 맺게 되었습니다. 위기가 없으면 성장도 없다고 했습니다. 나태하며 끈기 없고 게으른 저를 위해서 쓴 소리를 마다 않고 채찍질 해주시고 큰 힘이 되어주신 분들에게 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

가장 먼저 저를 있게 해주신 주님께 감사 드립니다.

통합과정을 생각하고 들어와서는 폐만 끼치는 게 아닌지 매번 죄송스럽지만 한 걸음 앞으로 나아가기 위해서 도움이 되는 좋은 말씀 많이 해주시고 수업과 실험에 있어서 많은 지도해주신 유은숙 교수님께 큰 감사를 전하고 싶습니다. 더불어 부족한 논문을 심사해주신 실험실 주임교수님이신 강희경 교수님과 조직학 교실의 박덕배 교수님 감사 드립니다. 짧은 2년 간의 학위 과정 동안 관심 가져 주셨던 은수용 교수님, 정성철 교수님, 조문제 교수님, 현진원 교수님, 고영상 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

처음 약리학 교실에 발을 들였을 때 기초가 탄탄하니까 금방 배울 거라며 많은 도움을 주셨던 강경진 박사님, 같이 동물 실험하면서 금방 친해질 수 있었던 항상 파이팅 넘치는 상철이 형님과 영종이 형, 세세한 부분 챙겨주시던 현은아 선생님께 고맙다는 말 전하고 싶습니다. 많은 대화를 나누지는 못했었지만 매 순간 조언 아끼지 않으셨던 강정일 박사님 둘째 탄생을 축하 드립니다. 실험실 선배님이자 동갑이라는 이유로 푹푹 몽쳤던 곧 드레스 입을 은지, 작년에 몇 주 보지 못했지만 인턴 조교 일 가르쳐주면서 친해진 유나, 실험 배우고 수업 듣느라 고생 많이 했던 수연이, 문정이에게도 감사를 전합니다. 실험실에서 가장 많이 부딪히고 이야기도 많이 나누고 매번 포기하고 도망가려는 저를 붙잡고 논문 준비에 함께 고생한 둘도 없는 동기 나진이, 덕분에 학위 취득하는 것 같아서 창피하고 고맙다. 둘 다 마무리 잘 돼서 다행이야!

의대 안에서 행정업무 또는 실험하는데 있어서 많은 도움을 주신 조교 선생님들, 강원석 선생님, 이정희 선생님, 생리학 교실, 생화학 교실, 미생물학 교실 분들에게도 감사함을 전합니다.

주말마다 같이 운동하고, 대회 출전하며 팀 이상의 가치와 형제애를 나누는 농구 동호회 인디A의 2014년 연임하실 김대원 회장님(결혼이라니!)과 태언, 주원,



진억, 형선, 준혁, 태완, 성욱, 은찬, 동우, 부민, 준석, 현준, 도윤, 지형 형님들, 태준, 석현 친구들, 병현, 관우, 성민, 제윤, 기표, 종호 동생들과 군대에서 고생하고 있을 창윤, 호균 동생들, Brotherhood!

그리고 어느덧 10년도 넘어버린 시간 동안 이어져 온 몇 안 되는 진짜 친구 홍수, 정체를 알 수 없는 모임의 수장 새롬이 누님, 민희 누님, 은정, 미리나, 일웅이 내 한탄 들어주느라 고생 많았다. 앞으로도 계속 들어주기 바래. 대학원 진학을 응원해줬던 소현이 누나, 결실 맺었습니다. 고마워요. 인생 선배로서 많은 조언 해주셨던 진용 아저씨, 마무리 되었으니 찾아 뵈게요. 앞으로 진짜 친구가 될지도 모를 알팍하고 단단한 끈으로 이어진 유재, 혜련, 아선 삼총사와 생물학과 선후배, 동기들 그리고 학교라는 울타리 안에서 만났던 모든 분들, 저 아직 살아 있습니다! 앞으로 더 기대하세요!

지금은 천국에 계시는 할아버지, 서울에서 손자 생각해주시는 할머니, 외가댁 식구들 자주 생각하지 못하고 찾아 뵈지 못해 죄송합니다. 매 순간 어떤 일이 있어도 일단 저를 믿어주시는 든든한 버팀목 저희 아버지와 한 번 더 생각해보고 기도로 임하라고 말씀해주시는 지원군 우리 어머니, 서로 놀리고 물어 뜯고 할퀴느라 정신 없지만 생각 깊고 예쁜(?) 동생 (학점 잘 받은 거 축하!), 세계에 없는 네 명이 한 가족으로 살고 있음에 항상 감사하고 있습니다.

다 알리지 못하고 연락 드리지 못해 죄송하고 기억하지 못하지만 제가 잘못된 길을 가려고 할 때마다 옳은 길로 이끌어준 등대 위의 불빛 같은 주위 모든 분들에게 진심으로 감사하다는 말 전하고 싶습니다. 고맙습니다.