

# Fibroblasts 세포주의 HSP70에 대한 DBD-bio-plasma의 effects: Cell에서 Heat Shock에 의한 Molecular Level 변화로의 새로운 접근법

김경연<sup>1</sup>, 이준영<sup>1</sup>, 남민경<sup>1</sup>, 최은하<sup>2</sup>, 임향숙<sup>1\*</sup>

## Effects of DBD-bio-plasma on the HSP70 of Fibroblasts: A New Approach on Change of Molecular Level by Heat Shock in the Cell

Kyoung-Yeon Kim<sup>1</sup>, Junyeong Yi<sup>1</sup>, Min-Kyung Nam<sup>1</sup>, Eun Ha Choi<sup>2</sup>, and Hyangshuk Rhim<sup>1\*</sup>

Received: 22 November 2014 / Accepted: 20 January 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Plasma is an ionized gas mixture, consisting of neutral particles, positive ions, negative electrons, electronically excited atoms and molecules, radicals, UV photons, and various reactive species. Also, plasma has unique physical properties distinct from gases, liquids, and solids. Until now, non-thermal plasmas have been widely utilized in bio-medical applications (called bio-plasma) and have been developed for the plasma-related devices that are used in the medical field. Although numerous bio-plasma studies have been performed in biomedicine, there is no confirmation of the non-thermal effect induced by bio-plasma. Standardization of the biological application of plasma has not been evaluated at the molecular level in living cells. In this context, we investigated the biological effect of bio-plasma on living cells. Hence, we treated the fibroblasts with Dielectric Barrier Discharge bio-plasma (DBD), and assessed the characteristic change at the molecular level, one of the typical cellular responses. Heat shock protein 70 (HSP70) regulates its own protein level in response to stimuli. HSP70 responds to heat shock by increasing its own expression at the molecular level in

cells. Hence, we confirmed the level of HSP70 after treatment of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) with DBD. Interestingly, DBD-plasma induced cell death, but there was no difference in the level of HSP70, which is induced by heat shock stimuli, in DBD-treated MEFs. Our data provide the basic information on the interaction between MEFs and DBD, and can help to design a molecular approach in this field.

**Keywords:** Heat shock protein 70, HSP70, DBD-plasma, Plasma, Heat shock, Non-thermal plasma

### 1. INTRODUCTION

플라즈마는 이온화된 가스로 고체, 액체, 기체와는 다른 제 4의 물질상태를 나타내는 말이다 [1,2]. 플라즈마는 전기적인 방전에 의해 생성되며 중성입자, 양이온, 음전자, 전기적으로 들뜬 원자와 분자, 라디칼, UV 광양자, 다양한 활성종 등으로 이루어져 있다 [1].

고온 플라즈마 가스의 온도는 수천 K (Kelvin)에 이른다 [1]. 고온 플라즈마 기계들의 경우, 상온보다 훨씬 높은 온도의 플라즈마를 생성하며 [1] 그 효과는 강력한 열의 전도에 기인하기 때문에 비특이적일 뿐만 아니라 조절제어 하기도 어려움이 따른다 [3]. 반면 저온 플라즈마의 경우 상온과 가까운 온도를 유지할 수 있는 것으로 알려져 있다 [1]. 저온 플라즈마는 비활성표면의 살균이나 [4-6] 표면 조작을 통한 세포부착의 조절 [7,8]에 적용되어 왔다. 또한 저온 플라즈마는 혈액응고를 유도하고 [5,9], 세포증식을 촉진하며 [10], 세

<sup>1</sup>가톨릭대학교 의생명건강과학과

<sup>1</sup>Department of Medicine and Health Sciences, College of Medicine, the Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea  
Tel: +82-2-2258-7475, Fax: +82-2-594-2385  
e-mail: hrhim@catholic.ac.kr

<sup>2</sup>광운대학교 플라즈마 바이오과학 연구센터

<sup>2</sup>Plasma Bioscience Research Center, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea

포의 transfection을 향상하는 [11] 등 의료 및 생물학 연구 분야에서 다양하게 적용되고 있다. 최근 연구들을 살펴보면 생체에 직접적으로 적용하기 위한 저온 플라즈마의 필요성이 더욱 부각되고 있으며 이에 따른 연구들이 늘어나고 있다 [1,5].

Dielectric Barrier Discharge (DBD)는 가스 heating이 없는 전기적으로 안전한 플라즈마를 생성하는 것으로 알려져 있다 [1,12]. 지금까지의 DBD에 의한 열 자극과 관련된 논문은 DBD-플라즈마를 처리한 후, 기계의 온도를 측정하거나 [13] 조직 일부의 외관상 형태 또는 세포의 현미경학적 형태의 변화를 관찰하는 것뿐이었다 [5,13]. 최근 플라즈마는 의학 분야에서 치료 및 미용의 목적으로 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 따라서 플라즈마에 의한 생체 내 분자적 관점에 관한 연구의 필요성이 증가하고 있다. 그러나 아직까지 실제로 DBD-플라즈마에 의한 열 자극이 없는지를 세포수준의 분자적 관점에서 연구한 논문은 없었다.

Heat shock proteins (HSPs)는 유도성이고 (inducible) 구성적으로 발현 (constitutively express)되는 방어관련 단백질으로 다양한 스트레스로부터 단백질 품질관리 시스템의 조절을 통해 세포의 항상성을 유지한다. Heat shock protein 70 (HSP70)은 misfolding된 단백질을 refolding하는 분자 샤페론으로서 기능을 주로 하는 중요한 세포단백질이다 [14]. 세포는 자극조건에서 살아남기 위해 복잡한 매커니즘을 통한 반응을 한다 [15,16]. Heat shock protein 70 (HSP70)은 열 자극, UV, oxidative stress,  $\gamma$  radiation 등의 다양한 자극에 의해 heat shock response를 일으킨다[17]. Heat shock response 매커니즘은 다음과 같다. 세포의 세포질에서 HSP70이 heat shock transcription factor 1 (HSF1)과 결합해있다가 세포가 스트레스를 받으면 HSP70과 HSF1이 분리된다. HSP70은 세포 내의 스트레스에 의해 변성된 단백질과 결합한다. 반면, HSF1은 phosphorylation과 trimerization되어 핵으로 이동한 후 HSP70의 발현을 조절하는 프로모터인 heat shock element (HSE)에 결합하여 HSP70의 발현을 증가시킨다 [18,19]. 이러한 과정을 거쳐 HSP70은 스스로 발현 양을 조절한다.

세포에 열 자극을 주어 세포내의 HSP70의 양을 증가시키고 이에 따른 세포 내의 매커니즘을 연구한 논문들이 있다 [20,21]. HSP70은 U937 세포에서 42°C 30분의 열 자극을 준 후 37°C에서 12시간을 배양하였을 때 그 양이 증가하였다는 보고가 있었다 [21]. 또한 세포사멸의 일종인 apoptosis의 과정 중 최종적으로 일어나는 것은 DNA의 단편화인데 [22], U937세포에 43°C 열 자극을 20분 이상 주었을 때 DNA의 단편화가 43°C 열 자극을 주는 시간이 증가할수록 대조군보다 증가 폭이 훨씬 크다는 보고가 있었다 [21]. 이들을 종합해보면, 세포가 받은 열 자극이 세포에서 HS70의 양을 증가시키고, 이 자극이 보다 치명적일 경우 DNA의 단편화가 일어나는 세포사멸의 유형 중 하나인 apoptosis를 유도한다. 세포가 열 자극을 받으면 세포 내에 misfold된 단백질들이 생성되며 이 단백질들은 세포 내에서 응집되고 heat shock response에 의해 증가된 HSP70에 의해 제거된다 [20].

지금까지 서술하였듯이, 세포에 열 자극이 주어질 경우 세포는 생체의 시스템을 통해 이러한 반응들을 일으킨다. 이 논문에서 우리는 세포가 자극을 받았을 때 반응하여 세포 내에서 스스로 양을 증가시키는 HSP70의 특징을 이용하여 DBD-plasma에 의한 열 자극의 여부를 세포수준의 분자적 관점에서 조사하고자 한다.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1. 세포배양

사용한 MEF는 배 발생으로부터 14.5일째 된 mouse embryo (E14.5)로부터 분리된 섬유모세포이다. 이 세포를 10% fetal bovine serum (FBS, Life technologies, California)과 1X penicillin/streptomycin (50 units/ml of penicillin and 50 mg/ml of streptomycin)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Life technologies)배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태로 배양하여 실험에 사용하였다.

### 2.2. DBD-플라즈마의 처리

MEF는 60 mm dish에 약 80% confluence가 되게 배양하였다. 배양된 세포는 dish의 바닥에 attach된 상태로 배양액에 잠긴 채 DBD-플라즈마의 처리가 이루어졌다. 2000 cc/min air gas를 주입하면서 플라즈마를 각각 3, 5, 10분을 처리한 후 7시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태로 배양한 후 세포를 수거하였다.

### 2.3. 열 자극의 처리

새로운 배양액에 열처리를 하여 37°C와 45°C까지 각각의 온도를 올린 후 세포의 기존 배양액을 제거한 후 열처리한 배양액으로 교체한다. 각각의 온도로 설정한 드라이오븐에 1분 동안 넣어 두었다가 배양액을 제거한다. 그 후 가열되지 않은 배양액으로 교체 후 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태로 배양한 후 세포를 수거하였다.

### 2.4. 면역블로팅 (Immunoblotting, IB)

배양한 MEF를 scraper로 긁어 harvest 후, RIPA lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Tryton X-100, 1% sodium deoxycholate]와 protease inhibitor의 mixture로 suspension하여 ice에 30분간 incubation하였다. Cell debris를 제거하기 위해서 4°C에서 13,200 rpm으로 30분간 centrifugation한 후, cell lysate를 회수하였다. Bradford protein assay (Bio-Rad, CA, USA)로 cell lysate 내 단백질 농도를 정량하였다. Protein sample (25 mg)은 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 분리하였다. 면역블로팅 분석을 위해 gel을 nitrocellulose membrane (Whatman, German)으로 transfer시켰다. Nitrocellulose membrane을 blocking용액 (5% non-fat dried milk in TBS-T)에 넣어 상온에서 30분 동안 incubation한 후, TBS-T [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20]로

10분간 3회 반복 세척하였다. Nitrocellulose membrane은 블로킹용액에  $\beta$ -tubulin antibody (Sigma) 1 / 2000,  $\beta$ -actin antibody (Sigma) 1 / 5000 그리고 HSP70 anti-body (stressgen) 1 / 1000으로 각각 희석한 용액에 1시간 동안 incubation하였다. 그리고 HRP-conjugated secondary antibody가 1 / 5000으로 희석된 블로킹용액으로 상온에서 1시간 동안 다시 incubation하였다. 중간 세척은 TBS-T로 10분간 3회 반복하였다. 마지막으로 nitrocellulose membrane은 화학발광키트 (ECL, Amersham Bioscience, UK) 용액에 2분간 incubation한 후, X-ray 필름 (AGFA, Mortsels, Belgium)에 현상하였다.

## 2.5. 세포사멸 분석 (Apoptosis assay)

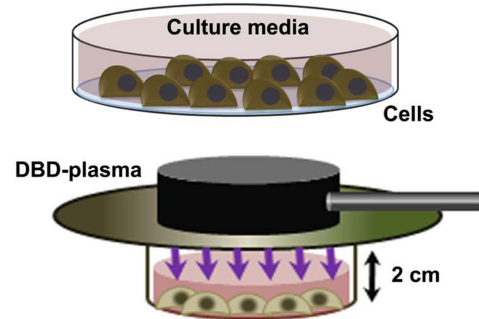
세포사멸 (Apoptosis)는 annexin V staining을 이용해 측정하였다. MEF 세포에 2000 cc/min의 Air gas를 주입하면서 플라즈마를 각각 3, 5, 10분을 처리한 후 7시간 동안 배양하였다. 세포의 배양액을 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 5분간 2회 세척하였다. 그리고 annexin-binding buffer (BD Pharmingen, 559763)를 넣고 5분간 상온에서 incubation하였다. Annexin V-Alexa Fluor647 (Invitrogen, A23204)를 5  $\mu$ L 넣고 빛을 차단한 상태에서 15분간 incubation 시켰다. 마지막으로 annexin-binding buffer로 5분간 2회 세척한 후 현미경으로 관찰하였다.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Observation of physics term: Evaporation of steam from cell culture media for 1 min- DBD-plasma treatment

최근 우리의 연구논문에서 MEF 세포에 argon-plasma jet (Ar-PJ)를 처리하여 항암제 개발의 중요한 타겟으로 알려진 세포내 골격구조를 이루는 미세섬유인 액틴의 골격구조를 붕괴시키는 현상을 관찰하였다 [23]. 이때 사용하였던 injector는 펜의 형태로, 플라즈마의 조사는 전체 MEF 세포들이 깔려있는 부분들 중 일정 부위에 집중적으로 이루어졌다. 이 부위 (dead zone)의 세포들은 물리적인 힘에 의해 cover glass로부터 떨어지거나기도 하였고 각각의 다른 zone들의 세포에 미치는 영향에 차이가 있었다 [23]. 우리는 플라즈마를 조사하기 위한 실험들을 setting하는 과정에서 펜의 형태인 plasma jet는 물리적인 힘에 의한 효과를 배제할 수가 없다는 생각이 들었다. 따라서 세포들이 분포하는 전체의 면에 동일하게 플라즈마를 조사할 수 있는 DBD-플라즈마로 조사하였다. 또한 플라즈마를 생체에 적용하기 위해서는 실질인 생체의 조건에서 플라즈마가 조사되어야 하므로, 세포들은 60 mm의 dish에 부착 (attach)된 채 배양액이 있는 상태에서 플라즈마의 처리가 이루어졌다 (Fig. 1).

1분 동안 플라즈마의 처리 후, 플라즈마 처리된 배양액을 담은 dish의 배양액 위쪽으로 수증기가 맺히는 현상을 발견할 수 있었다. 이는 플라즈마가 배양액에 열 자극을 주어 수증기가 발생하였을 가능성이 있다. 1분간 플라즈마를 조사



**Fig. 1.** Schematic setup of the DBD-bio-plasma treatment on the cell. Cells were attached to the bottom of the 60 mm that was filled with media. Under these conditions, cells were treated with DBD-plasma.

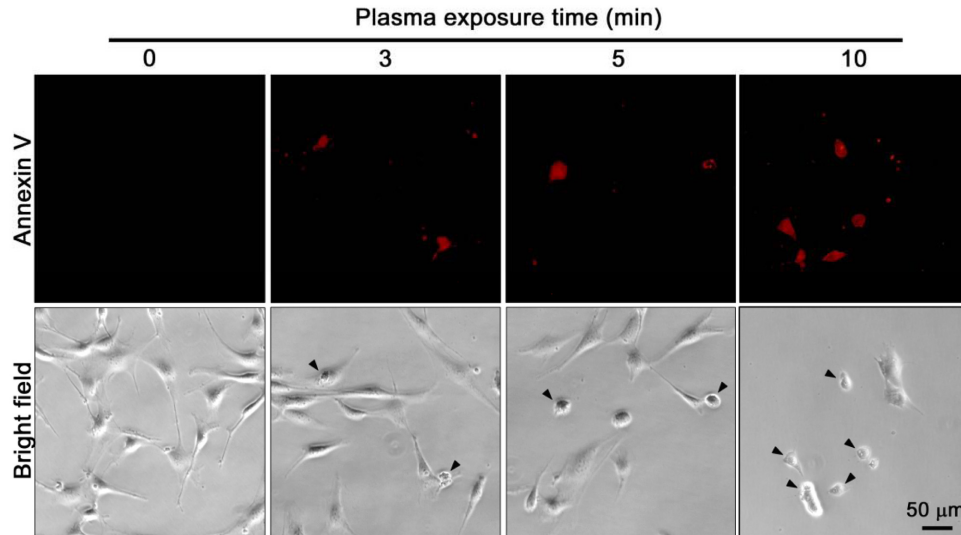
한 DBD-플라즈마 기계의 온도가 30°C 미만이고 5분을 조사하였을 때 device의 온도가 35°C를 유지하였다는 논문이 발표되었다 [13]. 하지만 4분 사이에 기계의 온도가 5°C나 올라갔으며 1분간 플라즈마 조사를 받은 배양액에서 수증기가 나왔기 때문에 플라즈마에 의해 세포가 받은 자극 - 특히 열 자극 - 에 대해 확인해 볼 필요가 있다.

### 3.2. Observation of microscopic term: Induction of cell death by DBD-plasma of MEFs

우리는 MEF 세포에 플라즈마 처리를 하였을 때 어떠한 변화를 일으키는 지 확인해 보기로 하였다. 플라즈마를 처리한 후 세포들의 형태를 관찰한 결과 세포사멸이 일어난 것을 확인하였고 세포사멸이 일어났음을 확인하는 실험을 진행하였다. 그 1차 적인 방법으로 플라즈마를 3, 5, 10분 처리한 후 세포사멸 - 특히 apoptosis - marker로 알려진 Annexin V로 염색을 한 후 현미경을 통해 확인해보았다. 플라즈마를 처리하지 않은 MEF세포의 모양은 세포 양단에 세포질 돌기를 가진 평평하고 긴 fibroblast의 전형적인 형태를 보인다. 반면 3, 5, 10분의 플라즈마 처리 시간에 따라 MEF세포는 둥근 모양으로 응축된 세포사멸이 일어난 세포의 수가 증가하는 것을 볼 수 있다. 그리고 플라즈마의 처리시간이 증가할수록 Annexin V에 의해 염색이 된 세포의 수도 또한 증가하는 것을 알 수 있다 (Fig. 2). 이로써 플라즈마는 세포에 자극을 주어 세포사멸을 유도한다는 것을 알 수 있으며 이러한 효과가 순수한 플라즈마에 의한 효과인지 앞서 의혹을 제기한 열이 발생하여 생긴 효과인지 확인해 볼 필요가 있다고 판단하였다.

### 3.3. Observation of molecular term: No response to DBD-associated heat stimulus of MEFs

지금까지는 세포수준에서 분자적 매커니즘을 통해 열 자극을 받았는지를 확인한 논문은 없었다. 세포는 미세한 자극에도 반응을 하여 분자적인 매커니즘을 일으키며 자극에 의해 특정 유전자를 발현시킨다 [24-26]. 그렇기 때문에 세포수준에서 열 자극을 받았는지 확인하기 위해 열 자극에 반응을



**Fig. 2.** DBD bio-plasma induces cell death - apoptosis - of MEFs. After treatment with DBD bio-plasma for 0, 3, 5, 10 min, MEF cells were stained with annexin V-Alexa Fluor647 and analyzed by a fluorescence microscopy (upper, Axiovisoin LE Rel 4.4.). Untreated cells were primarily annexin V negative, indicating that they were viable and not undergoing apoptosis. Plasma-treated cells were annexin V positive. This indicates that they were death and undergoing apoptosis. And Morphology of DBD bio-plasma-untreated and treated MEF cells were visualized by a microscope (lower). Arrows indicate that cells are undergoing apoptosis. Scale bar = 50  $\mu$ m, red: stained with Annexin V-Alexa Fluor647.

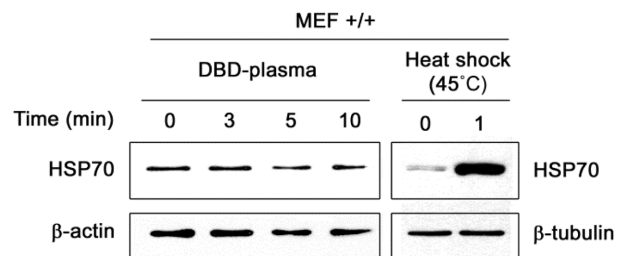
하는 분자의 변화를 확인해보기로 하였다.

MEF에 플라즈마의 처리는 대기 중에서 이루어졌다. 이 세포들이 플라즈마에 의한 열 자극을 받았는지를 분자수준에서 확인하기 위해, 우선 똑같이 대기 중에서 MEF세포에 열 자극을 준 후, 열 자극에 반응하는 분자를 확인해보아야 한다. 우리는 배양액을 각각 37°C와 45°C로 온도를 올렸다. 그리고 각각의 온도에 해당하는 배양액으로 교체 후 세포를 배양하는 incubator가 아닌 각각의 온도로 맞춰진 드라이오븐에 1분 동안 넣어두었다. 그 후, 각각의 배양액을 제거하고 37°C의 배양액으로 교체한 후 24시간을 배양하였다.

HSP70은 열 자극에 반응을 하는 분자 샤페론으로서, U937 세포에 42°C 30분의 열 자극을 준 후 37°C에서 12시간을 배양하였을 때 그 양이 증가하였다 [21]. 우리는 MEF에 열 자극을 드라이오븐에서 처리하였으나 세포를 배양하는 incubator에 비해 온도가 떨어질 가능성도 있어 열 자극 온도를 45°C로 설정하였다. 또한 우리는 여러 번의 실험을 통해 플라즈마의 조사 이후 배양시간이 길어지면 세포들이 죽는다는 것을 알았다. 세포들이 죽을 경우 HSP70이 세포 내에서 증가하는 패턴을 볼 수 없기 때문에 배양시간을 7시간으로 설정하였다.

MEF 세포에 45°C의 배양액을 처리했을 때,  $\beta$ -tubulin의 양이 일정한 반면 HSP70의 양은 대조군에 비해 증가한 것을 알 수 있다. 이 데이터는 MEF 세포가 열 자극에 반응하여 배양 시간 동안 세포 내에서 HSP70의 양을 증가시켰다는 것을 나타낸다. 그러나 DBD-플라즈마를 3, 5, 10분으로 처리시간을 늘렸음에 불구하고 대조군과 비교해보면 HSP70의 양이 변

화가 없다는 것을 알 수 있다 (Fig. 3). MEF세포에 열 자극을 주었을 때 HSP70의 양이 증가하였으나 DBD-플라즈마를 처리하였을 때는 변화가 없었다. 이 결과들을 종합해보면 DBD-플라즈마는 MEF세포에 세포사멸을 유도하며 이러한 세포사멸은 열 자극에 의한 것이 아니라는 것을 HSP70이라는 분자의 양이 증가하지 않았음을 통해 알 수 있다. 또한 DBD-플라즈마는 HSP70을 증가시킬 만큼의 자극을 세포에 주지 않는다. DBD-플라즈마를 처리했을 때 세포 내에서 샤페론으로 작용하는 분자인 HSP70의 양이 증가하지 않았다는 것은 DBD-플라즈마가 세포 수준에서 열 자극에 의한 피해를 주지 않는다고 할 수 있다. 또한 최근 우리가 발표한 논



**Fig. 3.** There was no DBD bio-plasma-mediated increase in the expression of HSP70. The expression of HSP70 was increased in MEFs after 45°C heat shock treatment of our system. We investigated whether the heat-induced increase in HSP70 expression was caused by DBD bio-plasma treatment. No difference in the HSP 70 expression was observed in MEFs, regardless of DBD bio-plasma treatment.

문에서 Ar-PJ에 의한 세포 내 골격구조의 붕괴에 관한 효과가 열 자극에 의한 것이 아니라는 것을 시사한다 [23].

최근 암 치료를 목적으로 플라즈마를 적용하는 연구들이 증가하고 있다 [1,23,27]. 세포사멸의 종류에는 apoptosis와 necrosis가 있는데, 플라즈마를 처리하여 암세포에서 apoptosis를 유도했다는 연구결과들이 있었다 [1,13,28]. 플라즈마가 항암효과를 거두었다는 연구결과들이 늘어나고 있는 시점에서, 플라즈마를 처리한 세포에서 HSP70의 양이 증가되지 않았다는 우리의 결과는 플라즈마에 의한 열 자극에 대한 가능성을 배제할 수 있다. 따라서 생체에 적용할 경우 플라즈마에 대한 부작용을 일으킬 가능성을 줄일 수 있다는 점을 시사한다.

또한 우리는 이 논문에서 지금까지의 저온 플라즈마 논문들에서 제기되어온 열 자극의 여부를 조직의 외관상 형태 또는 세포의 현미경적 형태에서 벗어나 세포수준의 분자적 관점에서 확인하였다. 플라즈마에 의한 자극을 분자적 매커니즘의 관점에서 관찰하는 새로운 접근법이 앞으로의 바이오 플라즈마 연구 분야에 많은 기여를 할 것이다.

#### 4. CONCLUSION

본 연구결과에서는 DBD-플라즈마가 MEF세포에 적용되었을 때 세포사멸이 유도되었으며 이러한 세포사멸이 열 자극에 의한 것이 아니라는 것을 열 자극에 반응하는 것으로 알려진 분자 샤페론인 HSP70의 양이 변화하지 않았음을 통해 밝혔다. 열 자극을 받은 세포들에는 misfold 단백질들이 생성되며 이 단백질들은 세포 내에서 응집되고 heat shock response에 의해 증가된 HSP70에 의해 제거된다.[20] 지금까지 서술하였듯이, 세포에 열 자극이 주어질 경우 세포는 생체의 시스템을 통해 이러한 반응들을 일으킨다. 지금까지 플라즈마의 연구 분야에서는 저온 플라즈마에 의한 열 자극 여부의 궁극적인 문제가 해결되지 않고 있었다. 우리는 열 자극의 여부를 조직 일부의 외관상 형태이나 세포의 현미경적 형태의 변화를 보는 수준을 벗어나 세포에서 일어나는 분자적 매커니즘을 이용하여 확인하였다. 우리는 이 논문을 통해 DBD-플라즈마가 MEF세포에 처리되었을 때 세포 내 분자적 수준에서 열 자극을 받지 않았음을 밝혔다. 또한, DBD-플라즈마를 처리했을 때 세포 내에서 HSP70의 양이 증가하지 않았다는 것은 DBD-플라즈마가 세포 수준에서 열 자극으로 인한 피해를 주지 않는다는 것임을 알 수 있다.

그리고 HSP70은 세포사멸기전에서 세포사멸을 억제하는 역할을 하며 [29,30], 이러한 기전을 통해 여러 약물이나 자극에 대한 내성에도 관여하는 것으로 알려져 있다 [31-35]. 이 논문에서 DBD-플라즈마에 의해 세포사멸이 유도된 반면 HSP70의 분자의 양이 증가하지 않았다는 결과는 DBD-플라즈마가 생체에 적용될 경우 제기될 부작용에 관한 가능성을 낮추어 줄 것이다.

플라즈마를 실제 세포와 조직에 조사하고 더 나아가 실제

로 임상적인 연구까지 발전하기 위해서는 플라즈마에 의한 세포수준의 분자적 매커니즘까지 고려해야한다. 이러한 관점에서 이 논문이 앞으로의 플라즈마의 연구에 많은 기여를 할 것으로 사료된다.

#### Acknowledgements

이 연구는 한국연구재단(No.NRF-2010-0027963)과 2013년 가톨릭중앙의료원 성의기초과학 연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

#### REFERENCES

1. Kalghatgi, S., C. M. Kelly, E. Cerchar, B. Torabi, O. Alekseev, A. Fridman, G. Friedman, and J. Azizkhan-Clifford (2011) Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS One* 6: e16270.
2. Fridman, G., G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, and A. Fridman (2008) Applied plasma medicine. *Plasma Process. Polym.* 5: 503-533.
3. Vargo, J. J. and M. MD (2004) Clinical applications of the argon plasma coagulator. *Gastrointest. Endosc.* 59: 81-88.
4. Laroussi, M. (2005) Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art. *Plasma Process. Polym.* 2: 391-400.
5. Fridman, G., M. Peddinghaus, M. Balasubramanian, H. Ayan, A. Fridman, A. Gutsol, and A. Brooks (2006) Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem. Plasma Process.* 26: 425-442.
6. Sladek, R. E. J. and E. Stoffels (2005) Deactivation of Escherichia coli by the plasma needle. *J. Phys. D-Appl. Phys.* 38: 1716-1721.
7. Kieft, I. E., M. Kurdi, and E. Stoffels (2006) Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultured cells. *Plasma Science, IEEE Trans. Plasma Sci.* 34: 1331-1336.
8. Kieft, I. E., D. Darios, A. J. M. Roks, and E. Stoffels (2005) Plasma treatment of mammalian vascular cells: a quantitative description. *Plasma Science, IEEE Trans. Plasma Sci.* 33: 771-775.
9. Kalghatgi, S. U., G. Fridman, M. Cooper, G. Nagaraj, M. Peddinghaus, M. Balasubramanian, V. N. Vasilets, A. Gutsol, A. Fridman, and G. Friedman (2007) Mechanism of blood coagulation by non-thermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. *Plasma Science, IEEE Trans. Plasma Sci.* 35: 1559-1566.
10. Kalghatgi, S., G. Friedman, A. Fridman, and A. M. Clyne (2010) Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann. Biomed. Eng.* 38: 748-757.
11. Leduc, M., D. Guay, R. L. Leask, and S. Coulombe (2009) Cell permeabilization using a non-thermal plasma. *New J. Phys.* 11: 115021.
12. Eliasson, B., W. Egli, and U. Kogelschatz (1994) Modelling of dielectric barrier discharge chemistry. *Pure Appl. Chem.* 66: 1275-1286.
13. Panngom, K., K. Y. Baik, M. K. Nam, J. H. Han, H. Rhim, and E.

- H. Choi (2013) Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma. *Cell Death Dis.* 4: e642.
14. Muchowski, P. J. and J. L. Wacker (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 11-22.
  15. Parsell, D. A. and S. Lindquist (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27: 437-496.
  16. Morimoto, R. I. and M. G. Santoro (1998) Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat. Biotechnol.* 16: 833-838.
  17. Jäättelä, M. (1999) Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* 248: 30-43.
  18. Kiang, J. G. and G. C. Tsokos (1998) Heat shock protein 70kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* 80: 183-201.
  19. Whitesell, L. and S. Lindquist (2009) Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin. Ther. Targets* 13: 469-478.
  20. Arslan, M. A., M. Chikina, P. t. Csermely, and C. Söti (2012) Misfolded proteins inhibit proliferation and promote stress-induced death in SV40-transformed mammalian cells. *FASEB J.* 26: 766-777.
  21. Li, C. Y., J. S. Lee, Y. G. Ko, J. I. Kim, and J. S. Seo (2000) Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* 275: 25665-25671.
  22. Obrenovitch, T. P. (2008) Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiol. Rev.* 88: 211-247.
  23. Han, J. H., M. K. Nam, Y. H. Kim, D. W. Park, E. H. Choi, and H. Rhim (2012) Effects of argon-plasma jet on the cytoskeleton of fibroblasts: implications of a new approach for cancer therapy. *KsBB J.* 27: 308-312.
  24. Werner, S. L., D. Barken, and A. Hoffmann (2005) Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science* 309: 1857-1861.
  25. Ohmori, Y., and T. A. Hamilton (1994) Cell type and stimulus specific regulation of chemokine gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 198: 590-596.
  26. Chow, N. A., L. D. Jasenosky, and A. E. Goldfeld (2014) A distal locus element mediates IFN- $\gamma$  priming of lipopolysaccharide-stimulated TNF gene expression. *Cell Rep.* 9: 1718-1728.
  27. Huang, J., W. Chen, H. Li, X. Q. Wang, G. H. Lv, M. L. Khosa, M. Guo, K. C. Feng, P. Y. Wang, and S. Z. Yang (2011) Deactivation of A549 cancer cells in vitro by a dielectric barrier discharge plasma needle. *J Appl Phys.* 109: 053305.
  28. Kim, W., K. C. Woo, G. C. Kim, and K. T. Kim (2011) Nonthermal-plasma-mediated animal cell death. *Journal of Physics D: Applied Physics* 44: 013001.
  29. Beere, H. M., B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen, and D. R. Green (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2: 469-475.
  30. Choudhury, S., S. Bae, Q. Ke, J. Y. Lee, J. Kim, and P. M. Kang (2011) Mitochondria to nucleus translocation of AIF in mice lacking Hsp70 during ischemia/reperfusion. *Basic Res. Cardiol.* 106: 397-407.
  31. Garrido, C., E. Schmitt, C. Cand, N. Vahsen, A. Parcellier, and G. Kroemer (2003) HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* 2: 579-584.
  32. Evans, C. G., L. Chang, and J. E. Gestwicki (2010) Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *J Med Chem.* 53: 4585-4602.
  33. Ciocca, D. R. and S. K. Calderwood (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10: 86-103.
  34. Patury, S., Y. Miyata, and J. E. Gestwicki (2009) Pharmacological targeting of the Hsp70 chaperone. *Curr. Top Med. Chem.* 9: 1337-1351.
  35. Xia, Y., Y. Liu, P. Rocchi, M. Wang, Y. Fan, F. Qu, J. L. Iovanna, and L. Peng (2012) Targeting heat shock factor 1 with a triazole nucleoside analog to elicit potent anticancer activity on drug-resistant pancreatic cancer. *Cancer Letters* 318: 145-153.