

## 담배 니코틴에 의한 사람 태아 성상세포에서 종양괴사인자(TNF- $\alpha$ )의 발현 억제작용

손일홍 · 이성익 · 양현덕 · 한선정 · 석승한 · 이재규<sup>†</sup> · 김재현<sup>‡</sup> · 박주영<sup>#</sup> · 문형인 · 이성수<sup>§,\*</sup>

원광대학교 의과대학 산본병원 신경과학교실, 인암뇌신경연구센터

<sup>†</sup>원광대학교 의과대학 산본병원 응급의학과

<sup>‡</sup>원광대학교 의과대학 산본병원 정신과

<sup>#</sup>연세대학교 원주의과대학 미생물학교실

<sup>§</sup>연세대학교 원주의과대학 신경과학교실

(2007. 3. 21 접수)

## The Inhibitory Effect of Nicotine on TNF- $\alpha$ Expression in Human Fetal Astrocytes

Il Hong Son, Sung Ik Lee, Hyun Duk Yang, Sun Jung Han, Seung Han Suk, Jai Kyoo Lee<sup>†</sup>,  
Jae Hyun Kim<sup>‡</sup>, Joo Young Park<sup>#</sup>, Hyung-In Moon and Sung Soo Lee<sup>§,\*</sup>

Department of Neurology and Inam Neuroscience Research Center, Sanbon Medical Center, Wonkwang University,  
Kyunggi-Do 435-040, Korea

<sup>†</sup>Department of Emergency, Sanbon Medical Center, Wonkwang University, Kyunggi-Do 435-040, Korea

<sup>‡</sup>Department of Psychiatry, Sanbon Medical Center, Wonkwang University, Kyunggi-Do 435-040, Korea

<sup>#</sup>Department of Microbiology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Kangwon-Do 220-710, Korea

<sup>§</sup>Department of Neurology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Kangwon-Do, 220-710, Korea

(Received March 21, 2007)

**요 약.** 니코틴은 사람 대식세포에서 interleukin 2 (IL-2)와 종양괴사인자 (tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ )가 생성되는 것을 억제하는데, 이러한 억제작용은 cytokine 유전자 발현 중 전사단계에서 전사인자의 활성을 억제함으로써 일어난다. 이러한 니코틴의 면역반응 억제작용은 아프타성궤양 및 궤양성대장염, 알레르기성폐포염, 건초열 등에서도 보고되고 있다. 만일 중추신경계에서도 위와 같은 니코틴의 면역억제 작용이 일어난다면 다발성경화증과 같은 면역반응 매개질환의 치료에 새로운 전기가 마련될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 중추신경계의 여러 면역반응 매개질환의 병태생리에 대한 이해를 넓히고자, 이미 알려진 니코틴의 cytokine 생성억제가 사람 중추신경계의 성상세포에서도 일어남을 확인하고 그 억제기전을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 사람 태아 성상세포에 다양한 농도의 니코틴과 IL-1 $\beta$ 를 처리한 다음 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현 정도와 NF- $\kappa$ B의 활성을 비교, 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 1. 사람 태아 성상세포를 0.1-20  $\mu$ g/ml의 니코틴으로 처리해 본 결과 10  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 세포독성능이 나타나기 시작하였다. 2. 사람 태아 성상세포에 IL-1 $\beta$ 를 처리하면 2시간만에 TNF- $\alpha$  mRNA가 최대로 발현되었으며 그 이후로는 점진적으로 감소하였다. 3. 사람 태아 성상세포를 1 및 0.1  $\mu$ g/ml의 니코틴으로 전처리한 후 IL-1 $\beta$ 로 자극한 군에서는 IL-1 $\beta$  단독 처리군에 비해 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 감소하는 양상을 보였다. 1  $\mu$ g/ml의 니코틴을 처리한 경우에는 8시간 이후부터 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 현저하게 감소하여 12시간에 최대로 감소하였다. 또한 0.1  $\mu$ g/ml의 니코틴을 처리한 군에서는 24시간에 가장 현저하게 감소하였다. 4. 성상세포에 IL-1 $\beta$ 로 처리한 군에서는 강력한 NF- $\kappa$ B의 활성을 확인할 수 있었으며, 니코틴을 전처리하고 IL-1 $\beta$  자극한 군에서는 NF- $\kappa$ B의 활성이 감소하였다. 결론적으로 일정농도 이상의 니코틴은 세포독성효과를 나타내나 적절한 농도와 시간 경과후 니코틴은 사람 태아 성상세

포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도되는 TNF- $\alpha$ 의 발현 감소를 유도하며, 이는 NF- $\kappa$ B의 활성을 감소시킴으로써 나타난다고 생각된다.

**주제어:** TNF- $\alpha$ , 사람 태아 성상세포, 니코틴, NF- $\kappa$ B

**ABSTRACT.** The Tumor necrosis factor- $\alpha$ , (TNF- $\alpha$ ), is involved in the pathogenesis of multiple sclerosis and contributes to the degeneration of oligodendrocytes as well as neurons. Nicotine has been found to have immunosuppressive and inflammation-suppressing effects. Astrocytes, the major glial cells in the CNS, are capable of producing TNF- $\alpha$  at both the mRNA and protein levels in response to interleukin-1 (IL-1) or TNF- $\alpha$ . Nicotine has been shown to influence glial cell functions. To order to explore the role of astrocytes in the production of TNF- $\alpha$ , astrocytes were pretreated with nicotine and are stimulated with IL-1 $\beta$  to determine their effects on TNF- $\alpha$  production. The results are as follows. Cytotoxic effects of nicotine on human fetal astrocytes were noted above 10  $\mu$ g/ml of nicotine. The effect of IL-1 $\beta$  on TNF- $\alpha$  mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes was maximal at 2 h after IL-1 $\beta$ (100 pg/ml) treatment. Human fetal astrocytes were pretreated with 0.1, 1, and 10  $\mu$ g/ml of nicotine and then stimulated with IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) for 2 h. The inhibitory effect of nicotine on expressions of TNF- $\alpha$  mRNA in human fetal astrocytes with pretreated 0.1  $\mu$ g/ml of nicotine is first noted at 8 hr, and the inhibitory effect is maximal at 12 h. The inhibitory effect at 1  $\mu$ g/ml of nicotine is inhibited maximal at 24 h. Nicotine at 0.1, 1 and 10  $\mu$ g/ml concentrations significantly inhibits IL-1 $\beta$ -induced NF- $\kappa$ B activation. Collectively, this study indicates that nicotine might inhibit the expression of TNF- $\alpha$  in activated human fetal astrocytes.

**Keywords:** TNF- $\alpha$ , Human fetal astrocytes, nicotine, NF- $\kappa$ B

## 서 론

1960년대 초 미국 보건부에서 본격적인 흡연과 건강에 대한 보고서가 나온 이래로 흡연은 현재 대부분의 산업국가에서 가장 중요한 예방할 수 있는 많은 질병원인이며 또 그로 인한 조기 사망에서도 가장 중요한 원인으로 알려져 있다. 그러나 흡연이나 니코틴이 몇몇 특정질환의 예방과 치료에 도움을 주는 경우도 보고되고 있는데, 첫 번째는 항에스트로젠 효과에 의해 흡연자에서 자궁의 섬유종양이나 자궁내막증의 발생빈도가 적다는 보고가 있다.<sup>1</sup> 두 번째로는 흡연이 중추신경계의 니코틴성 콜린성수용체 흥분작용으로 파킨슨씨병 및 알츠하이머씨 치매의 발생과도 역상관관계가 있다는 보고도 있다. 세 번째로 면역반응의 억제작용으로 흡연과 아프타성폐양의 발생이 역상관 관계에 있다는 보고도 있으며, 또한 폐양성대장염의 발생도 흡연과 역상관 관계를 보여 현재 담배를 피우는 사람은 한 번도 담배를 피우지 않은 사람에 비해 폐양성대장염의 발생위험이 매우 낮은 것으로 보고되어 있다. 이 외에도 흡연이나, 니코틴 껌 혹은 니코틴 패치에 의해 폐양성대장염의 증상이 완화되

었다는 보고나, 경피적 니코틴 투약에 의해 폐양성대장염의 재발이 억제된다는 보고가 있다. 이러한 폐양성대장염에 대한 니코틴의 작용은 대장의 점착성 표면 점액에 변화를 일으키거나, 혹은 염증매개체에 대한 작용을 통해 이루어질 것으로 생각되고 있다.<sup>2</sup> 그리고 *in vitro* 실험에서도 니코틴은 사람 대식세포로부터 interleukin 2(IL-2)와 종양괴사인자(tumor necrosis factor-alpha; TNF- $\alpha$ )가 생성되는 것을 억제한다고 보고되었으며, 이러한 억제작용은 cytokine 유전자 발현 중 전사단계에서 전사인자의 활성을 억제함으로써 일어난다고 보고되었다.<sup>3</sup> 이러한 니코틴의 면역반응 억제작용은 아프타성폐양 및 폐양성대장염 이외에도 알레르기성폐포염, 건초열 등에서도 보고되고 있으나<sup>4</sup> 중추신경계의 면역반응 매개질환에서는 아직 보고된 바 없다. 만약 사람 중추신경계에서도 이와 같은 니코틴의 면역억제 작용이 일어난다면 다발성경화증 같은 면역반응 매개질환의 치료에도 새로운 전기가 될 수 있다. 그러므로 본 연구를 통하여 이미 알려진 니코틴의 cytokine 생성억제가 중추신경계의 사람 태아 성상세포에서도 일어남을 확인하고 그 억제기전을 밝힐 수 있다면 다발성경화증을 비롯한 중추신경계의

여러 면역반응 매개질환의 병태생리에 대한 이해를 넓히고 새로운 치료방법을 개발할 수 있게 될 것이다.

본 연구에서는 아직까지 연구된 바 없는 사람 태아 중추신경계 내에서의 염증 반응을 매개하는 물질인 TNF- $\alpha$ 의 발현을 조절할 수 있는 면역억제 물질로서의 니코틴의 효과와 작용 기전을 알아보기 위하여 사람 태아의 성상세포에서 니코틴의 세포 독성을 측정하였고, 여러 농도의 니코틴 전처리후 TNF- $\alpha$  mRNA의 양을 측정하였고, TNF- $\alpha$  mRNA의 발현 억제 기전을 보기 위해 겔지연분석법으로 TNF- $\alpha$  발현에 관여하는 것으로 알려진 NF- $\kappa$ B의 발현 농도를 측정하였다. 이러한 결과는 TNF- $\alpha$  생성과 관련이 있는 사람 중추 신경계내의 여러 면역 반응 매개 질환의 치료에 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료되어 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 사람 태아 성상세포의 일차 배양

치료목적으로 임신이 중단된 20주에서 25주 사이의 사람 태아의 뇌 조직으로부터 성상세포를 분리하였으며<sup>5</sup> 분리한 성상세포의 확인을 위해 glial fibrillary acidic protein(GFAP)으로 간접 형광 염색한 결과 95% 이상이 양성임을 확인하였다. Dubecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco BRL, USA) 배지의 조성은 high glucose formula를 사용하여 glucose는 최종농도 6 g/l로 하였으며, 여기에 2 mM glutamine, 0.1 mM NEAA, 100 U/ml의 페니실린과 100  $\mu$ g/ml의 스트렙토마이신을 추가하였다.

### 성상세포에서 니코틴의 세포독성 테스트

배양된 성상세포를 0.25% 트립신을 이용하여 분리하였으며,  $10^4$  cell/well이 되게 RPMI 1640 배지에 부유시켜 96 well plate에 접종하였다. 니코틴(Sigma, St. Louis, MO)을 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 후 4일간 배양하였다. 대조군으로는 니코틴 처리 대신에 phosphate buffer saline(PBS)를 동일한 조건으로 처리하여 배양하였다. 배양 후 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma) 시약을 처리하여 4시간 더 배양 후 배양액을 버리고 DMSO를 처리하여 formazan 침전물을 녹여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 성상세포에서 TNF- $\alpha$ 의 생성유도

배양된 성상세포는 0.25% 트립신을 이용하여 분리하였으며, 적절한 수의 세포를 6 well plate(Coning)에 넣어주고 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclone, Logan, UT)가 함유된 DMEM에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 serum free DMEM으로 교환하고 100 pg/ml의 IL-1 $\beta$  (R & D systems, Minneapolis, MN, USA)를 첨가한 다음 1, 2, 4, 8, 12 및 24시간 후에 각 군의 세포로부터 RNA를 분리하였다. 니코틴 전처리 군에서는 배지를 serum free DMEM으로 교환하고 니코틴을 농도별로 전처리하여 24, 12, 8, 4 및 2시간 동안 배양한 후 100 pg/ml의 IL-1 $\beta$ 으로 2시간 처리하였고, 대조군은 serum free DMEM 첨가하여 함께 배양한 후 동일하게 100 pg/ml의 IL-1 $\beta$ 를 2시간 처리하였다.

### 총 RNA 분리

시간에 따라 자극된 성상세포들은 TRIzol 을 사용하여 RNA를 분리하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 Trizol 용액을 넣어서 세포를 분해한 다음 chloroform 추출과 isopropanol 침전과정을 거쳐서 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC)를 처리한 증류수에 녹인 후 spectrophotometer를 사용하여 정량하였다.

### 역전사중합효소연쇄반응

성상세포에서 추출한 total RNA 2  $\mu$ m을 oligo(dT) primer 1  $\mu$ g(Promega, Madison, WI)과 70 °C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에서 5분간 정착시킨 다음 여기에 buffer, 40 U RNase inhibitor(Promega), 200 U MMLV reverse transcriptase(Promega)를 첨가하여 42 °C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. IL-1 $\beta$ 에 의해 유도되는 시간별 TNF- $\alpha$ 의 농도를 확인하기 위하여 TNF- $\alpha$  primer(sense 5'-GACTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCA-3', antisense 5'-GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCAGAC-3')를 사용하였으며, PCR조건은 95 °C 5분 후 94 °C 30초, 60 °C 30초, 72 °C 1분으로 30회 반복한 다음 72 °C 7분, 4 °C로 반응을 종료하였다. RT-PCR에서 증폭된 RNA의 농도를 확인하기 위하여 동일한 cDNA를 주형으로 GAPDH primer(sense 5'-ACCA CAGTCCATGCCATCAC-3', antisense 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTGA-3')를 사용하여 95 °C 5분 후 94 °C 30초, 60 °C 30초, 72 °C 1분으로 25회

반복 한 다음 72 °C 7분, 4로 반응을 종료하였다. PCR 수행 후 증폭산물은 1% agarose gel에 전기 영동하여 확인하였으며 그 결과를 image analyzer로 읽은 다음 Quantity One Software(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 수치를 비교하였다.

### 핵단백 분리

성상세포들을 IL-1 $\beta$ 로 자극한 후 핵단백을 분리하였다. 핵단백 분리는 Dignam<sup>6</sup>의 방법을 변형하여 시행하였다. 100 mm 배양접시에 배양된 세포를 trypsin을 이용하여 떼어낸 후 차가운 PBS로 3회 세척하였다. 원심 분리된 세포 침전물을 400  $\mu$ l의 buffer A(10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF)를 넣고 섞어준 후 얼음 위에 15 분간 방치하였다. 10% Nonidet-P 40을 25  $\mu$ l 넣고 10초간 진탕한 후 15초간 원심 분리하여 핵침전을 얻었다. 상층액을 제거한 후 30  $\mu$ l의 buffer C(20 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM KCl, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF)를 넣고 4 °C에서 15분간 혼든 후 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. 핵단백은 실험에 사용할 때까지 -70 °C에 보관하였으며 단백질 정량은 Bradford<sup>7</sup> 방법(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하였다.

### 겔지연 분석법

Nuclear factor kappa(NF- $\kappa$ B)의 활성을 측정하기 위하여 겔지연 분석법을 이용하였다. 미세원심관에 8  $\mu$ g의 핵단백과 2  $\mu$ g의 poly(dI·dC)(Amersham, Little Chalfont, UK), 1  $\mu$ g의 방사선동위원소로 표지된 probe를 넣은 후 완충용액을 이용하여 20  $\mu$ g의 반응 용액 내 20 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT 이 되도록 농도를 맞추었다. 실온에서 20분간 두었다가 반응액을 6% non-denaturing polyacrylamide gel에 loading 하여 0.25 X Tris-Boric acid-EDTA 완충액에서 200 V로 2시간 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝난 후 겔을 떼어 여과지에 붙여서 말린 후 X-ray 필름에 12 시간 이상 노출시킨 후 현상하였다. Probe는 NF- $\kappa$ B에 특이적으로 결합하는 두 가닥 oligonucleotide (5'-AGITGAGG GGATTCCAGGC-3')에 T4 kinase (promega)와 [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP(NEN Life Science Products, Boston, MA, USA)를 이용하여 방사선동위원소를 말단에 표지하여 사용하였다.

## 결 과

### 니코틴의 세포독성능

일차 배양된 사람의 뇌세포를 성상세포 특이항체인 GFAP를 이용하여 간접형광면역 염법을 시행하여 신경세포(neuron) 또는 회돌기교세포(oligodendrocyte) 등과 같은 다른 신경교세포의 혼재 없이 성상세포가 순수하게 분리되었음을 확인하였다. 사람 태아 성상세포에 대한 니코틴의 감수성을 비교하기 위해 96 well culture plate에 성상세포를 각각 10<sup>4</sup> cell/well이 되도록 분주하였다. 니코틴은 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4일간 배양하였다. 배양 후 MTT법으로 세포독성능을 측정된 결과 10  $\mu$ g/ml 이상에서 세포독성능이 나타나기 시작하였다(Fig. 1).

### IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ mRNA의 시간별 발현

IL-1 $\beta$  의해 유도되는 시간별 TNF- $\alpha$ 의 발현양상을 비교하기 위해 일차 배양된 성상세포에 IL-1 $\beta$ 를 100 pg/ml의 농도로 처리한 다음 1, 2, 4, 8, 12 및 24시간 후에 RNA를 분리하여 RT-PCR로 mRNA의 발현 양상을 비교하였다. 그 결과 IL-1 $\beta$  처리하지 않은 대조군에서는 TNF- $\alpha$  mRNA가 거의 발현되지 않았으나, IL-1 $\beta$  처리군에서는 자극 직후부터 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 유도되었다. 발현정도는 2시간 처리군에서 가장 높았고, 4시간 이후부터 지속적으로 감소하였다(Fig. 2).

### IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ mRNA 발현에 미치는 니코틴의 영향

IL-1 $\beta$  자극에 의해 사람 태아 성상세포로부터 유도된 TNF- $\alpha$ 의 발현에 미치는 니코틴의 역할을 알아보기 위해 일차 배양된 성상세포에 니코틴을 0.1, 1 및

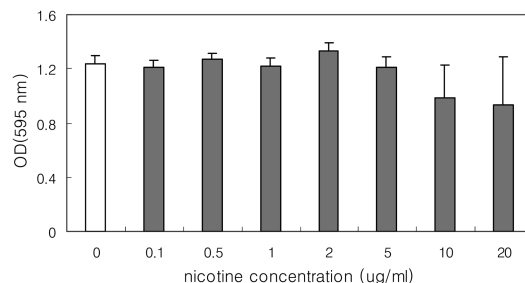


Fig. 1. The effect of nicotine on human fetal astrocytes. Human fetal astrocytes are incubated with nicotine at various concentrations and the cellular viability is determined with MTT assay.

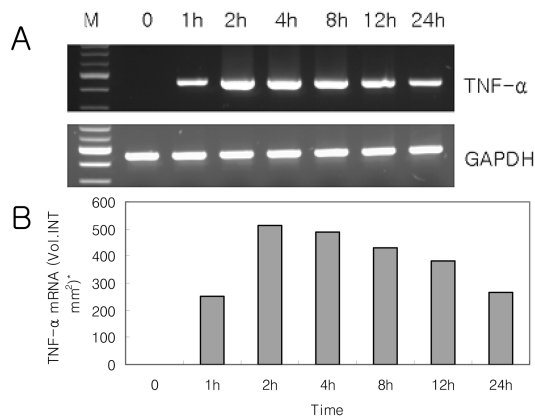


Fig. 2. The effect of IL-1 $\beta$  on TNF- $\alpha$  mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes. The astrocytes are treated with IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) for the indicated time periods. A, RT-PCRs using TNF- $\alpha$  and GAPDH primers are performed. B, The relative TNF- $\alpha$  mRNA expression levels are analysed using densitometer. \*volume intensity count per mm<sup>2</sup>.

10  $\mu$ g/ml의 3가지 농도로 전처리하여 24, 12, 8, 4 및 2시간 배양한 다음 TNF- $\alpha$ 의 발현을 유도하기 위해 100 pg/ml의 IL-1 $\beta$  2시간 배양하였다. 배양된 세포로 RT-PCR을 수행하여 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현양상을 비교하였다. 니코틴만 단독으로 처리한 군에서는 TNF- $\alpha$  mRNA가 발현되지 않았으며, 100 pg/ml의 IL-1 $\beta$  2시간 동안 처리하였을 때 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현양이 가장 많았으므로 100 pg/ml의 IL-1 $\beta$  2시간 동안 처리한 군을 대조군으로 사용하였다. 100 pg/ml의 IL-1 $\beta$  단독으로 처리한 군과 비교하였을 때 니코틴을 전처리한 군에서 TNF- $\alpha$  발현양이 니코틴의 처리 농도나 처리 시간에 따라 변화됨을 나타내었다(Fig. 3-5). 10  $\mu$ g/ml의 니코틴을 전처리한 군에서는 IL-1 $\beta$  처리한 군에 비해 그 발현양의 감소를 보이기는 했으나 현저한 차이를 나타내지는 않았다(Fig. 3). 반면에 니코틴을 1  $\mu$ g/ml 전처리한 군에서는 12시간 전처리 시에, 0.1  $\mu$ g/ml 전처리한 군에서는 24시간 전처리에 현저한 발현의 감소를 나타내었다. 그러나 이 경우에도 8시간 이내의 전처리군에서는 미미한 발현양의 감소만을 나타내었다(Fig. 4, 5).

#### NF- $\kappa$ B 활성화에 미치는 니코틴의 영향

니코틴이 사람 성상세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도되는 NF- $\kappa$ B의 활성화에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 성상세포에 니코틴을 0.1, 1 및 10  $\mu$ g/ml 씩 30분 동안 전처리한 후 100 pg/ml의 IL-1 $\beta$ 를 처리하여 30분 동안 자

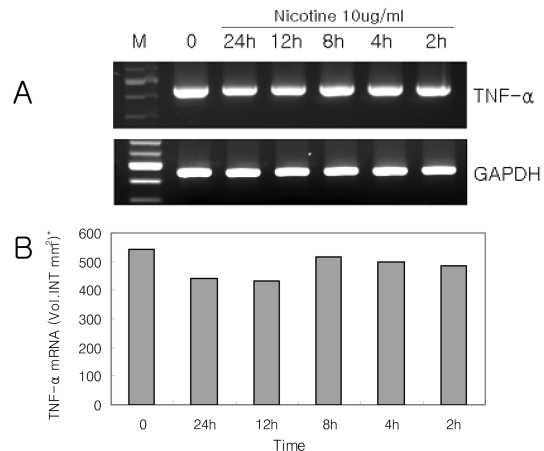


Fig. 3. The effect of nicotine (10  $\mu$ g/ml) on TNF- $\alpha$  mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes. Human fetal astrocytes are treated with 10  $\mu$ g/ml nicotine for the indicated time periods and then stimulated with IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) for 2 h. A, RT-PCRs using TNF- $\alpha$  and GAPDH primers are performed. B, The relative TNF- $\alpha$  mRNA expression levels are analysed using densitometer. \*volume intensity count per mm<sup>2</sup>.

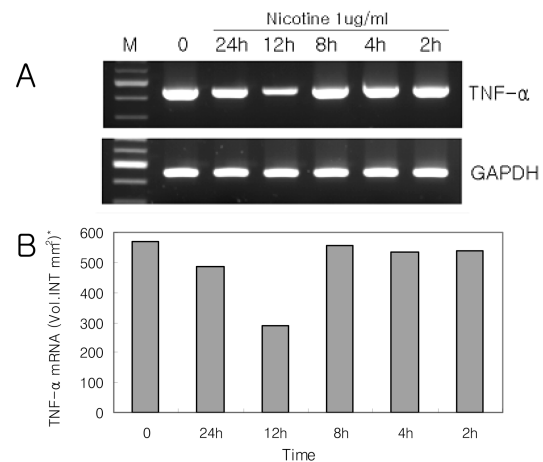


Fig. 4. The effect of nicotine (1  $\mu$ g/ml) on TNF- $\alpha$  mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes. Human fetal astrocytes are treated with 1  $\mu$ g/ml nicotine for the indicated time periods and then stimulated with IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) for 2 h. A, RT-PCRs using TNF- $\alpha$  and GAPDH primers are performed. B, The relative TNF- $\alpha$  mRNA expression levels are analysed using densitometer. \*volume intensity count per mm<sup>2</sup>.

극한 다음 겔지연 분석법을 이용하여 NF- $\kappa$ B의 활성을 측정하였다. 아무것도 처리하지 않았거나 니코틴만 처리한 성상세포에서는 NF- $\kappa$ B의 활성이 확인되지 않았다. 성

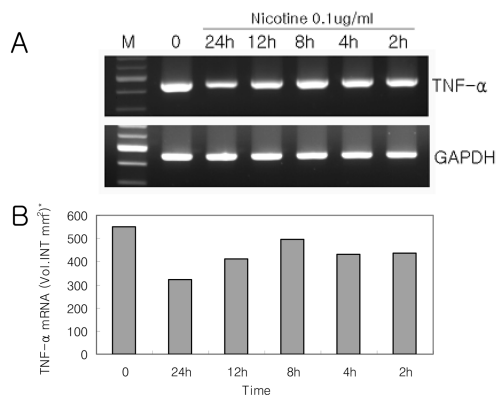


Fig. 5. The effect of nicotine (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) on TNF- $\alpha$  mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes. Human fetal astrocytes are treated with 0.1  $\mu\text{g/ml}$  nicotine for the indicated time periods and then stimulated with IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) for 2 h. A, RT-PCRs using TNF- $\alpha$  and GAPDH primers are performed. B, The relative TNF- $\alpha$  mRNA expression levels are analysed using densitometer. \*volume intensity count per  $\text{mm}^2$ .

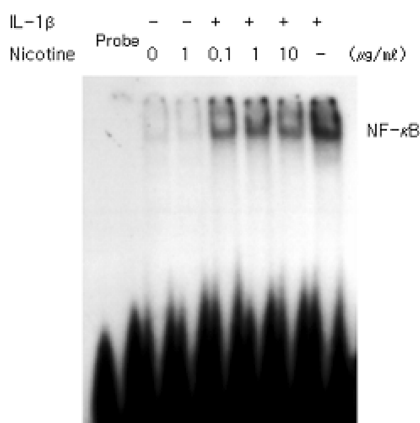


Fig. 6. Effects of nicotine treatment on IL-1 $\beta$ -induced NF- $\kappa\text{B}$  activation. Electrophoretic mobility shift analysis of NF- $\kappa\text{B}$  binding activity in nuclear protein extracts from IL-1 $\beta$  activated, nicotine-pretreated human fetal astrocytes. Nuclear extracts were incubated with  $^{32}\text{P}$ -end-labeled NF- $\kappa\text{B}$  consensus oligonucleotide in binding reactions. The binding complexes were analyzed on nondenaturing polyacrylamide gels in 0.25 $\times$ TBE and visualized by autoradiography.

상세포에 IL-1 $\beta$ 만 처리한 군에서는 강력한 NF- $\kappa\text{B}$ 의 활성을 확인할 수 있었으며, 니코틴을 전처리하고 IL-1 $\beta$  자극한 군에서는 NF- $\kappa\text{B}$ 의 활성이 감소하였다(Fig. 6).

## 고 찰

니코틴은 특유하고 복합적인 약리작용을 갖고 있는

화학물질이다. 무색, 유성 알카로이드 액체로 담배 잎에만 존재하는 화학물질이다. 니코틴의 유해성에 대해서는 잘 알려져 있으며, 아편과 같은 수준의 습관성 중독을 일으키기 때문에 화학적으로 마약으로 분류되고 있는 물질이다. 본 실험은 니코틴을 처리하여 사람 태아 정상세포에서 IL-1 $\beta$ 로 유도된 TNF- $\alpha$ 의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 TNF- $\alpha$  mRNA 수준에서의 발현정도를 비교하였다. 먼저 정상 사람 정상세포에서는 TNF- $\alpha$ 의 발현이 극히 미약하므로 TNF- $\alpha$ 의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있는 IL-1 $\beta$ 를<sup>8</sup> 처리하여 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현을 유도한 후 시간별 발현농도를 비교하였다. 사이토카인을 처리하지 않은 그룹에서는 TNF- $\alpha$  mRNA가 거의 발현되지 않았으나, TNF- $\alpha$ 를 유도하는 것으로 알려져 있는 IL-1 $\beta$  처리 군에서는 시간별로 다른 발현양상을 보여 주었다. TNF- $\alpha$  mRNA는 IL-1 $\beta$ 처리 이후 점점 발현이 증가하여 2시간째에 가장 많은 발현을 나타냈으며, 이후부터 서서히 발현양이 줄어드는 것을 확인하였다. 따라서 일차 배양된 사람 태아의 정상세포에서 TNF- $\alpha$  mRNA가 시간에 따라 mRNA의 발현양상이 다르게 나타남을 확인할 수 있었다. 니코틴의 처리 농도에 따라서 발현양상의 변화를 확인하기 위해 니코틴을 10  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 일차 배양된 태아의 정상세포에 처리한 다음 IL-1 $\beta$ 를 100 pg/ml의 농도로 첨가하여 시간 별로 RNA를 분리해 RT-PCR을 수행하였다. 니코틴을 1  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 후 IL-1 $\beta$ 를 100 pg/ml로 자극한 군에서는 IL-1 $\beta$  단독 처리군에 비해 TNF- $\alpha$ 의 발현이 감소하는 양상을 보이는 것을 확인할 수 있었으며 이는 니코틴의 전처리가 TNF- $\alpha$  발현을 저해하는 역할을 하는 것임을 의미한다. 시간별로는 니코틴을 1  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리시에는 8시간째까지는 IL-1 $\beta$  처리 군에 비해 큰 차이를 보이지 않았으나 8시간 이후부터 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 니코틴을 0.1  $\mu\text{g/ml}$  처리시에는 24시간 처리시에 현저한 감소를 나타내 처리되는 니코틴의 농도에 따라 IL-1 $\beta$  의해 유도되는 TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제하는 작용 시간이 달라짐을 확인할 수 있었다. 반면 니코틴을 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 1차 배양된 사람의 정상세포에 처리한 후 100 pg/ml의 IL-1 $\beta$ 로 자극한 군에서는 IL-1 $\beta$  단독으로 처리하여 유도된 TNF- $\alpha$  mRNA와 비교하여 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 약간 감소하긴 하나 현저한 변화를 관찰할 수 없었다. 이는 니코틴의

세포 독성이 10  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 나타나므로 독성효과에 의해서 TNF- $\alpha$ 의 발현 억제 효과가 가려져있을 가능성이 있다. 기존 연구에 의하여 단백질 합성을 억제하면 세포들이 TNF- $\alpha$ 에 의해 더 잘 죽는다는 사실이 발견되었다. 이와 같은 발견에 따라 TNF- $\alpha$ 의 작용을 억제하는 단백질이 있을 것이라고 추정되었고, 많은 연구자들은 TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화되는 NF- $\kappa\text{B}$ 가 바로 그러한 역할을 한다고 주장하고 있고,<sup>9</sup> 일반적으로 transcription factor인 NF- $\kappa\text{B}$ 는 다양한 염증 관련인자들을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>10</sup> NF- $\kappa\text{B}$ 는 활성산소나 자외선과 같은 스트레스가 있는 상황이나 LPS, double stranded RNA와 같은 미생물성분, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인에 의해 활성화되며, 그 결과 angiotensinogen이나 보체, 아밀로이드 단백질과 같은 acute phase response protein을 생성하여 염증 반응을 진행시키거나, 혈관세포 부착인자-1(vascular cell adhesion molecule-1), 세포부착인자-1(intercellular adhesion molecule-1)과 같은 부착인자의 발현을 증가시켜 세포 이동과 재생에 관여하며, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\beta$ 와 같은 사이토카인의 분비를 촉진하여 면역세포들의 활성화하는 기능을 가지고 있다.<sup>11</sup> TNF- $\alpha$ 의 신호조절의 결과 중에서 많은 부분이 NF- $\kappa\text{B}$ 를 활성화하여 일어나며, 활성화된 NF- $\kappa\text{B}$ 는 apoptosis를 억제할 수 있는 분자를 합성하도록 하여 세포를 보호한다.<sup>12</sup> aoyuki 등<sup>13</sup>은 니코틴이 U937 세포에서 NF- $\kappa\text{B}$ 의 조절을 통해 염증매개 인자의 생성을 억제한다는 연구결과를 보고하였다. 이와 마찬가지로 본 실험에서도 사람 태아 성상세포에 니코틴을 전처리시 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도되는 NF- $\kappa\text{B}$ 의 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 니코틴 전처리시 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도되는 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 감소하는 결과와 비교하여 니코틴이 NF- $\kappa\text{B}$ 의 활성을 감소시켜 결과적으로 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현을 억제한다는 것을 뒷받침한다. 그러나 니코틴이 이외에도 니코틴성콜린성수용체 부위에 작용했을 가능성도 있고, NF- $\kappa\text{B}$ 에 의한 전사 이후의 과정에 작용하여 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현을 억제할 수 있으므로 추후 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다. 본 연구에서는 TNF- $\alpha$  mRNA를 측정하여 TNF- $\alpha$  단백질 발현을 보았지만 mRNA의 발현을 측정함으로써 단백질의 발현을 예측할 수 있었다. 신경교세포인 성상세포와 소교세포(microglia)에서의 TNF- $\alpha$  단백

질 발현양을 비교한 연구 결과에 따르면 무자극 군에서는 두 세포 모두 TNF- $\alpha$ 가 발현되지 않았으며, IL-1 $\beta$ 와 LPS로 자극한 후 발현양을 비교한 결과 성상세포에서는 IL-1 $\beta$ 에 의해 자극된 군에서는 TNF- $\alpha$ 의 양이 증가한 반면 LPS 자극 군에서는 변화가 없었다. 이와는 대조적으로 소교세포에서는 LPS에 의해서 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가되고 IL-1 $\beta$ 에 의해서는 변화되지 않는 결과를 나타냈으며 시간에 따라 다른 발현 양상이 나타나는 것을 알 수 있었다.<sup>14</sup> 따라 소교세포는 회돌기 교세포, 성상세포, 대식세포와 차이가 있을 것으로 판단됨에 따라 향후 중추신경계의 신경교세포중에서 성상세포와 더불어 면역 및 염증 반응을 담당하는 소교세포에 대한 니코틴의 역할에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되며, 더 나아가 사회적 관심이 점점 많아지고 있는 알츠하이머씨병이나 파킨슨씨병과 같은 퇴행성뇌신경질환과 니코틴과의 상관관계에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

이 논문은 원광대학교 의과대학 산본병원 인암뇌신경연구센터의 연구비 지원에 의해서 수행됨.

## 인 용 문 헌

- Holt, P. G.; Keast, D. E. *Bacteriol Rev* **1977**, *41*, 205.
- Motley, R. J.; Rhodes, J.; Williams, G. *J Pharm Pharmacol* **1990**, *42*, 288.
- Sugano, N.; Shimada, K.; Ito, K. *BBRC* **1998**, *252*, 25.
- Baron, J. A. *Br Med Bull* **1996**, *52*, 58.
- Haas, L. F. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **1992**, *55*, 430.
- Dignam, J. D.; Lebovitz, R. M.; Roeder, R. G. *Nucl Acids Res* **1983**, *11*, 1475.
- Bradford, M. M. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248.
- Wang, C. Y.; Mayo, M. W.; Baldwin, A. S. *Science* **1996**, *274*, 784.
- Tamatani, M.; Che, Y.H.; Matsuzaki, H. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 8531.
- Baldwin, A.S. *Annu Rev Immunol* **1996**, *14*, 649.
- Ghosh, S.; May, M. J.; Kopp, E. B. *Annu Rev Immunol* **1998**, *16*, 225.
- Van Antwerp, D. J.; Martin, S. J.; Kafri, T. *Science* **1996**, *274*, 787.
- Aoyuki, S.; Koichi, S.; Koichi, I. *BBRC* **1998**, *252*, 25.
- Benveniste, E. N.; Tang, L. P.; Law, R. M. *Int J Dev Neurosci* **1995**, *13*, 341.