

사람 태아 정상세포에서 니코틴에 의한
종양괴사인자(TNF- α)의 발현 억제작용

연세대학교 대학원

의 학 과

손 일 홍

사람 정상세포에서 니코틴에 의한
종양괴사인자(TNF- α)의 발현 억제작용

지도 이 성 수 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

손 일 홍

손일홍의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

항상 의사로서의 본분을 잃지 않고 살도록 가르침을 주시며 본 박사 논문이 잘 완성될 수 있도록 아낌없이 지도해 주신 이성수 선생님께 깊은 감사와 존경을 드립니다. 또한 연구가 시작될 때부터 마무리 될 때까지 세심한 조언과 격려를 해주신 박주영 교수님께 깊은 감사를 드리며, 바쁘신 중에도 귀중한 자료와 조언을 해주신 이영희 교수님, 조병필 교수님, 최선주 교수님과 실험에 많은 도움을 주신 미생물학교실의 서희석 선생님과 박현숙 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 제가 신경과 의사로서 첫발을 내디딜 때부터 항상 도움을 주시는 이지용 선생님께 진심어린 감사를 드립니다. 같은 병원에서 힘들지만 언제나 도움을 주시는 신경과식구들께 심심한 감사를 드리며, 제가 인생의 새로운 이정표를 갖도록 하고 의사로서의 굳은 신념을 갖도록 해주신 인암 윤성균 회장의 큰 은혜에 감사드립니다.

오늘의 제가 있기까지 깊은 사랑으로 키워주시고 항상 사랑으로 보살펴주시는 어머님과 장인, 장모님께 깊은 감사를 드리며, 형과 형수님, 매형과 누님, 처남에게 깊은 감사 말씀을 전합니다. 20년 가까운 긴 시간 동안 어려웠던 많은 일들을 묵묵히 곁에서 뒷바라지하며 항상 나에게 용기와 격려를 주는 소중한 아내와 사랑스런 딸 나예와 민정이와 함께 이 기쁨을 나누고자 합니다. 마지막으로 이 세상을 떠나신지 벌써 20여년이 되었지만 항상 저에게 용기를 주시는 아버님께 이 글을 드립니다.

2006년 6월

저자 씀

차 례

그림 차례	i
국문 요약	1
I 서론	3
II 재료 및 방법	4
1. 사람 태아 정상세포의 일차 배양	4
2. 정상세포에서 니코틴 세포독성 테스트	4
3. 정상세포에서 TNF- α mRNA의 생성유도	5
4. 총 RNA 분리	5
5. 역전사중합효소연쇄반응(RT-PCR)	5
6. 핵단백 분리	6
7. 겔지연 분석법	6
III. 결과	7
1. Nicotine의 세포독성능	7
2. IL-1 β 에 의해 유도된 TNF- α mRNA의 시간별 발현	8
3. IL-1 β 에 의해 유도된 TNF- α mRNA 발현에서 nicotine의 영향	9
4. NF- κ B 활성화에 미치는 nicotine의 영향	13
IV. 고찰	14
V. 결론	18
참고 문헌	19
영문 요약	23

그림 차례

Figure 1. The effects of nicotine in human fetal astrocytes	8
Figure 2. The effect of IL-1 β on TNF- α mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes	9
Figure 3. The effect of nicotine(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on TNF- α mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes	10
Figure 4. The effect of nicotine(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on TNF- α mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes	11
Figure 5. The effect of nicotine(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on TNF- α mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes	12
Figure 6. Effects of nicotine treatment on NF- κ B activation ..	13

국 문 요 약

사람 태아 성상세포에서 니코틴에 의한 종양괴사인자(TNF- α)의 발현 억제작용

니코틴은 사람 대식세포에서 interleukin 2 (IL-2)와 종양괴사인자 (tumor necrosis factor- α ; TNF- α)가 생성되는 것을 억제하는데, 이러한 억제작용은 cytokine 유전자 발현 중 전사단계에서 전사인자의 활성을 억제함으로써 일어난다. 이러한 니코틴의 면역반응 억제작용은 아프타성궤양 및 궤양성대장염, 알레르기성 폐포염, 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 생성 억제가 사람 중추신경계의 성상세포에서도 일어남을 확인하고 그 억제기전을 밝히 고자 하였다. 이를 위하여 사람 태아 성상세포에 다양한 농도의 니코틴과 IL-1 β 를 처리한 다음 TNF- α mRNA의 발현 정도와 NF- κ B의 활성을 비교, 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 사람 태아 성상세포를 0.1-20 μ g/ml의 니코틴으로 처리해 본 결과 10 μ g/ml 이상의 농도에서 세포독성능이 나타나기 시작하였다.
2. 사람 태아 성상세포에 IL-1 β 를 처리하면 2시간만에 TNF- α mRNA가 최대로 발현되었으며 그 이후로는 점진적으로 감소하였다.
3. 사람 태아 성상세포를 1 및 0.1 μ g/ml의 니코틴으로 전처리한 후 IL-1 β 로 자극한 군에서는 IL-1 β 단독 처리군에 비해 TNF- α mRNA의 발현이 감소하는 양상을 보였다. 1 μ g/ml의 니코틴을 처리한 경우에는 8시간 이후부터 TNF- α mRNA의 발현이 현저하게 감소하여 12시간에 최대로 감소하였다. 또한 0.1 μ g/ml의 니코틴을 처리한 군에서는 24시간에 가장 현저하게 감소하였다.
4. 성상세포에 IL-1 β 만 처리한 군에서는 강력한 NF- κ B의 활성을 확인할 수 있었으며, 니코틴을 전처리하고 IL-1 β 로 자극한 군에서는 NF- κ B의 활성이 감소하였다.

결론적으로 일정농도 이상의 니코틴은 세포독성효과를 나타내나 적절한 농도와 시간 경과후 니코틴은 사람 태아 성상세포에서 IL-1 β 에 의해 유도되는 TNF- α 의 발현 감소를 유도하며, 이는 NF- κ B의 활성을 감소시킴으로써 나타난다고 생각된다. 이러한 연구결과는 염증성 및 면역성 뇌신경질환의 치료와 TNF- α 의 저해제 개발에 대한 학문적 배경을 제공할 수 있으리라 사료된다.

핵심되는 말 : TNF- α , 사람 태아 성상세포, 니코틴, NF- κ B

사람 태아 정상세포에서 니코틴에 의한 종양괴사인자(TNF- α)의 발현 억제작용

<지도 이 성 수 교수>

연세대학교 대학원 의학과

손 일 홍

I. 서 론

1960년대 초 미국 보건부에서 본격적인 흡연과 건강에 대한 보고서가 나온 이래로 흡연은 현재 대부분의 산업국가에서 가장 중요한 예방할 수 있는 많은 원인이며 또 그로 인한 조기 사망에서도 가장 중요한 원인으로 알려져 있다.¹⁻³ 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.^{4,5} 두 번째로는 흡연이 중추신경계의 니코틴성콜린성수용체 흥분작용으로 파킨슨씨병 및 알츠하이머씨 치매의 발생과도 역상관관계가 있다는 보고도 있다.^{6,7,8} 세 번째로 면역반응의 억제작용으로 흡연과 아프타성궤양의 발생이 역상관관계에 있다는 보고도 있으며,^{9,10,11} 또한 궤양성대장염의 발생도 흡연과 역상관관계를 보여 현재 담배를 피우는 사람은 한 번도 담배를 피우지 않은 사람에 비해 궤양성대장염의 발생위험이 매우 낮은 것으로 보고되어 있다.¹² 이 외에도 흡연이나,¹³ 니코틴 껌 혹은 니코틴 패치에 의해^{14,15} 궤양성대장염의 증상이 완화되었다는 보고나, 경피적 니코틴 투약에 의해 궤양성대장염의 재발이 억제된다는 보고가 있다.¹⁶

이러한 궤양성대장염에 대한 니코틴의 작용은 대장의 점착성 표면 점액에 변화를 일으키거나,¹⁷ 혹은 염증매개체에 대한 작용을 통해^{18,19} 이루어질 것으로 생각되고 있다. 그리고 *in vitro* 실험에서도 니코틴은 사람 대식세포로부터 interleukin 2 (IL-2)와 종양괴사인자(tumor necrosis factor- α ; TNF- α)가 생성되는 것을 억제한다고 보고되었으며,^{20,21}

이러한 억제작용은 cytokine 유전자 발현 중 전사단계에서 전사인자의 활성을 억제함으로써 일어난다고 보고되었다.^{21,22} 이러한 니코틴의 면역반응 억제작용은 아프타성궤양 및 궤양성대장염 이외에도 알레르기성폐포염, 건초열 등에서도 보고되고 있으나²³ 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 생성 억제가 중추신경계의 사람 태아 정상세포에서도 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- α 의 발현을 조절할 수 있는 면역억제 물질로서의 니코틴의 효과와 작용 기전을 알아보기 위하여 사람 태아의 정상세포에서 니코틴의 세포 독성을 측정하였고, 여러 농도의 니코틴 전처리후 TNF- α mRNA의 양을 하였고, TNF- α mRNA의 발현 억제 기전을 보기 위해 겔지연분석법으로 TNF- α 발현에 관여하는 것으로 알려진 NF- κ B의 발현 농도를 측정하였다. 이를 바탕으로 TNF- α 생성과 관련이 있는 사람 중추신경계내의 여러 면역 반응 매개 질환의 치료 전략을 세우는데 기초적인 학문적 배경을 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사람 태아 정상세포의 일차 배양

치료목적으로 임신이 중단된 20주에서 25주 사이의 사람 태아의 뇌조직으로부터 정상세포를 분리하였으며²⁴ 분리한 정상세포의 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, Grand Island, NY, USA) 배지의 조성은 high glucose formula를 사용하여 glucose는 최종농도 6 g/l로 하였으며, 여기에 2 mM glutamine(Life Technologies, Palo Atto, CA, USA), 0.1 mM NEAA(Life Technologies), 100 U/ml의 페니실린과 100 μ g/ml의 스트렙토마이신(Life Technologies)을 추가하였다.

2. 정상세포에서 니코틴의 세포독성 테스트

배양된 정상세포를 0.25% 트립신(Life Technologies)을 이용하여 분리하였으며, 10^4 cell/well이 되게 RPMI 1640 배지(Life Technologies)에 부유시켜 96 well plate(Corning, Cambridge, MA)에 접종하였다. 니코틴(Sigma, St. Louis, MO)을 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 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 DMSO(Sigma)을 처리하여 formazan 침전물을 녹여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 정상세포에서 TNF- α 의 생성유도(MTT법)

배양된 정상세포는 0.25% 트립신을 이용하여 분리하였으며, 적절한 수의 세포를 6 well plate(Corning)에 넣어주고 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclone, Logan, UT)가 함유된 DMEM에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 serum free DMEM으로 교환하고 100 pg/ml 의 IL-1 β (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/ml 의 IL-1 β 으로 2시간 처리하였고, 대조군은 serum free DMEM 첨가하여 함께 배양한 후 동일하게 100 pg/ml 의 IL-1 β 를 2시간 처리하였다.

4. 총 RNA 분리

시간에 따라 자극된 정상세포들은 TRIzol (Life Technologies)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.

5. 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcription-PCR; RT-PCR)

정상세포에서 추출한 total RNA 2 μ g을 oligo(dT) primer 1 μ 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 β 에 의해 유도되는 시간별 TNF- α 의 농도를 확인하기 위하여 TNF- α primer (sense 5'-GACTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGT AGCA-3', antisense 5'-GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCAGAC-3')를 사용하였으며, PCR조건은 95°C 5분 후 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분으로 30 회 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'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3')를 사용하여 95°C 5분 후 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분으로 25 회 반복 한 다음 72°C 7분, 4°C로 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.

6. 핵단백 분리

정상세포들을 IL-1 β 로 자극한 후 핵단백을 분리하였다. 핵단백 분리는 Dignam²⁵의 방법을 변형하여 시행하였다. 100 mm 배양접시에 배양된 세포를 trypsin을 이용하여 떼어낸 후 차가운 PBS로 3회 세척하였다. 원심 분리된 세포 침전물을 400 μ l의 buffer A(10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF)를 넣고 섞어준 후 얼음 위에 15분간 방치하였다. 10% Nonidet-P 40을 25 μ l 넣어주고 10초간 진탕한 후 15초간 원심 분리하여 핵침전을 얻었다. 상층액을 제거한 후 30 μ 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 흔든 후 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. 핵단백은 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였으며 단백질 정량은 Bradford²⁶ 방법(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하였다.

7. 겔지연 분석법

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

III. 결 과

1. 니코틴의 세포독성능

일차 배양된 사람의 뇌세포를 정상세포 특이항체인 GFAP를 이용하여 간접형광면역 염색법을 시행하여 신경세포(neuron) 또는 회돌기교세포(oligodendrocyte) 등과 같은 다른 신경교세포의 혼재 없이 정상세포가 순수하게 분리되었음을 확인하였다. 사람 태아 정상세포에 대한 니코틴의 감수성을 비교하기 위해 96 well culture plate에 정상세포를 각각 10⁴ cell/well이 되도록 분주하였다. 니코틴은 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20 μ g/ml의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4일간 배양하였다. 배양 후 MTT법으로 세포독성능을 측정한 결과 10 μ g/ml 이상에서 세포독성능이 나타나기 시작하였다 (Fig. 1).

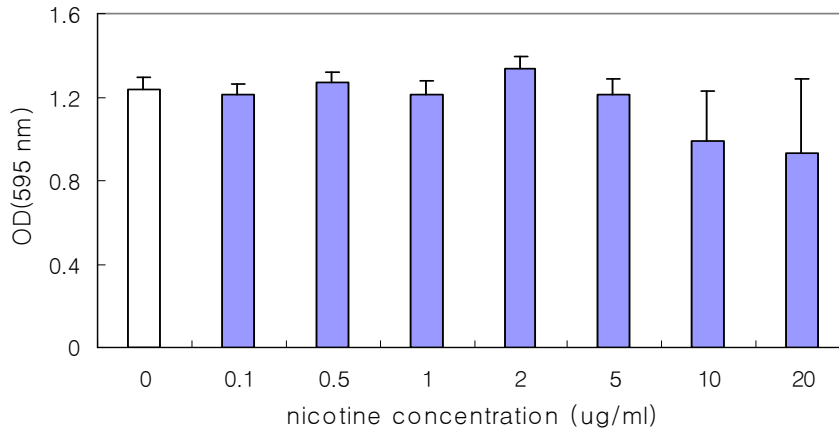


Figure 1. The effect of nicotine on human fetal astrocytes. Human fetal astrocytes are incubated with nicotine at various concentrations and the cellular viability is determined with MTT assay.

2. IL-1 β 에 의해 유도된 TNF- α mRNA의 시간별 발현

IL-1 β 에 의해 유도되는 시간별 TNF- α 의 발현양상을 비교하기 위해 일차 배양된 성상세포에 IL-1 β 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 β 을 처리하지 않은 대조군에서는 TNF- α mRNA가 거의 발현되지 않았으나, IL-1 β 처리군에서는 자극 직후부터 TNF- α mRNA의 발현이 유도되었다. 발현정도는 2시간 처리군에서 가장 높았고, 4시간 이후부터 지속적으로 감소하였다 (Fig. 2).

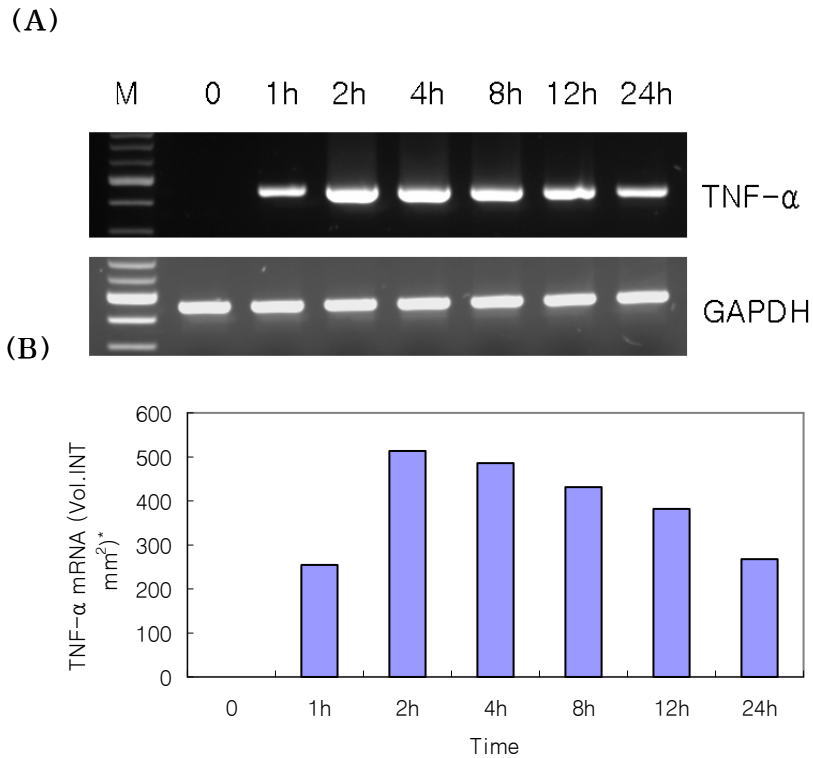


Figure 2. The effect of IL-1 β on TNF- α mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes. The astrocytes are treated with IL-1 β (100 pg/ml) for the indicated time periods. A, RT-PCRs using TNF- α and GAPDH primers are performed. B, The relative TNF- α mRNA expression levels are analysed using densitometer. * volume intensity count per mm².

3. IL-1 β 에 의해 유도된 TNF- α mRNA 발현에 미치는 니코틴의 영향

IL-1 β 의 자극에 의해 사람 태아 정상세포로부터 유도된 TNF- α 의 발현에 미치는 니코틴의 역할을 알아보기 위해 일차 배양된 정상세포에 니코틴을 0.1, 1 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 3가지 농도로 전처리하여 24, 12, 8, 4 및 2시간 배양한 다음 TNF- α 의 발현을 유도하기 위해 100 pg/ml의 IL-1 β 를 첨가하여 2시간 배양하였다. 배양된 세포로 RT-PCR을 수행하여 TNF- α mRNA의 발현양상을 비교하였다. 니코틴만 단독으로 처리한 군에서는 TNF- α mRNA가 발현되지 않았으며, 100 pg/ml의 IL-1 β 를 2시간 동안 처리하였을 때 TNF- α mRNA의 발현양이 가장 많았으므로 100 pg/ml의 IL-1 β 를 2시간 동안 처리한 군을 대조군으로 사용하였다. 100 pg/ml의 IL-1 β 만 단독으로 처리한 군과 비교하였을 때 니코틴을 전처리한 군에서 TNF- α 발현양이 니코틴의 처리 농도나 처리 시간에 따라 변화됨을 나타내었다 (Fig. 3-5). 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 니코틴을 전처리한 군에서는 IL-1 β 만 처리한 군에 비해

그 발현양의 감소를 보이기는 했으나 현저한 차이를 나타내지는 않았다 (Fig. 3). 반면에 니코틴을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 전처리한 군에서는 12시간 전처리 시에, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 전처리한 군에서는 24시간 전처리에 현저한 발현의 감소를 나타내었다. 그러나 이 경우에도 8시간 이내의 전처리군에서는 미미한 발현양의 감소만을 나타내었다 (Fig. 4, 5).

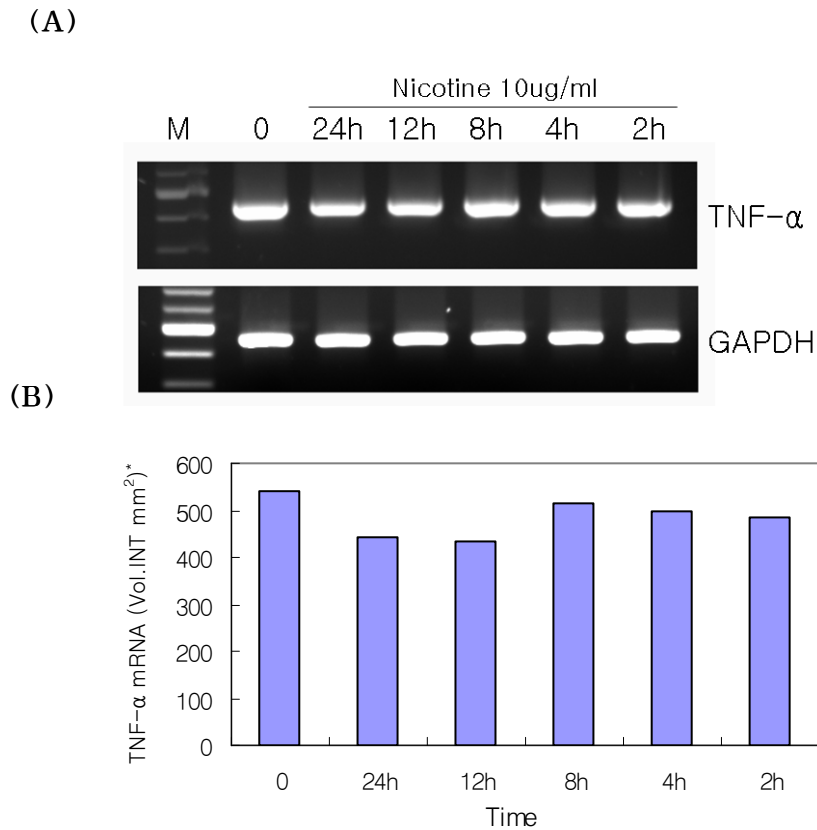
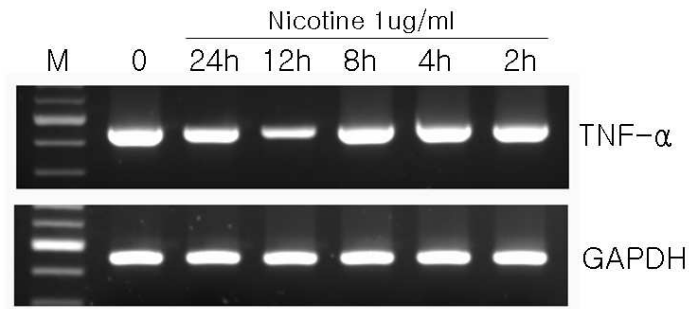


Figure 3. The effect of nicotine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on TNF- α mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes. Human fetal astrocytes are treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicotine for the indicated time periods and then stimulated with IL-1 β (100 pg/ml) for 2 h. A, RT-PCRs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

(A)



(B)

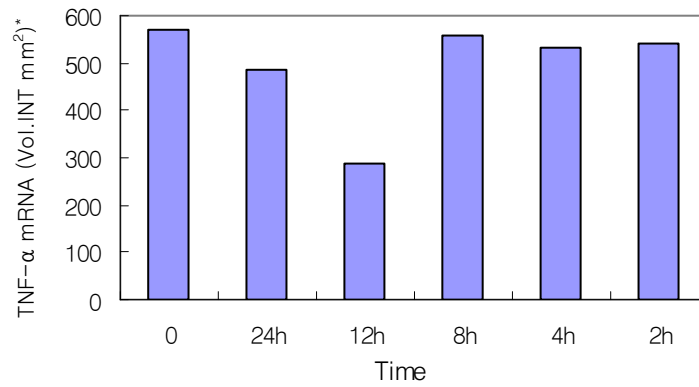


Figure 4. The effect of nicotine (1 μ g/ml) on TNF- α mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes. Human fetal astrocytes are treated with 1 μ g/ml nicotine for the indicated time periods and then stimulated with IL-1 β (100 pg/ml) for 2 h. A, RT-PCRs using TNF- α and GAPDH primers are performed. B, The relative TNF- α mRNA expression levels are analysed using densitometer. * volume intensity count per mm²

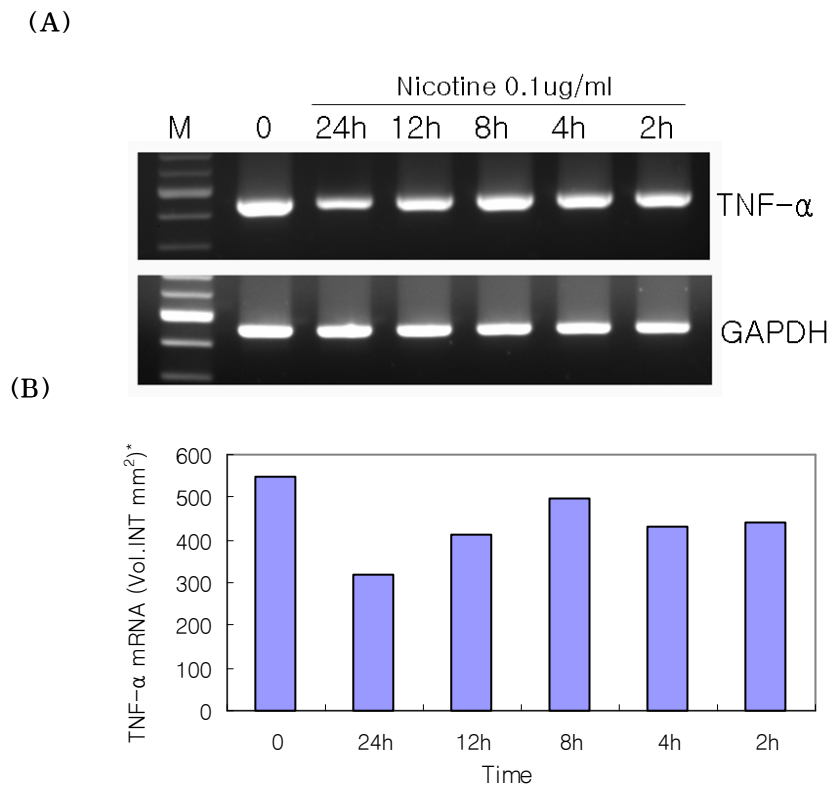


Figure 5. The effect of nicotine (0.1 $\mu\text{g/ml}$) on TNF- α mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes. Human fetal astrocytes are treated with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ nicotine for the indicated time periods and then stimulated with IL-1 β (100 pg/ml) for 2 h. A, RT-PCRs using TNF-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

4. NF- κ B 활성화에 미치는 니코틴의 영향

니코틴이 사람 정상세포에서 IL-1 β 에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 정상세포에 니코틴을 0.1, 1 및 10 μ g/ml 씩 30분 동안 전처리한 후 100 pg/ml의 IL-1 β 를 처리하여 30분 동안 자극한 다음 겔지연 분석법을 이용하여 NF- κ B의 활성을 측정하였다. 아무것도 처리하지 않았거나 니코틴만 처리한 정상세포에서는 NF- κ B의 활성이 확인되지 않았다. 정상세포에 IL-1 β 만 처리한 군에서는 강력한 NF- κ B의 활성을 확인할 수 있었으며, 니코틴을 전처리하고 IL-1 β 로 자극한 군에서는 NF- κ B의 활성이 감소하였다 (Fig. 6).

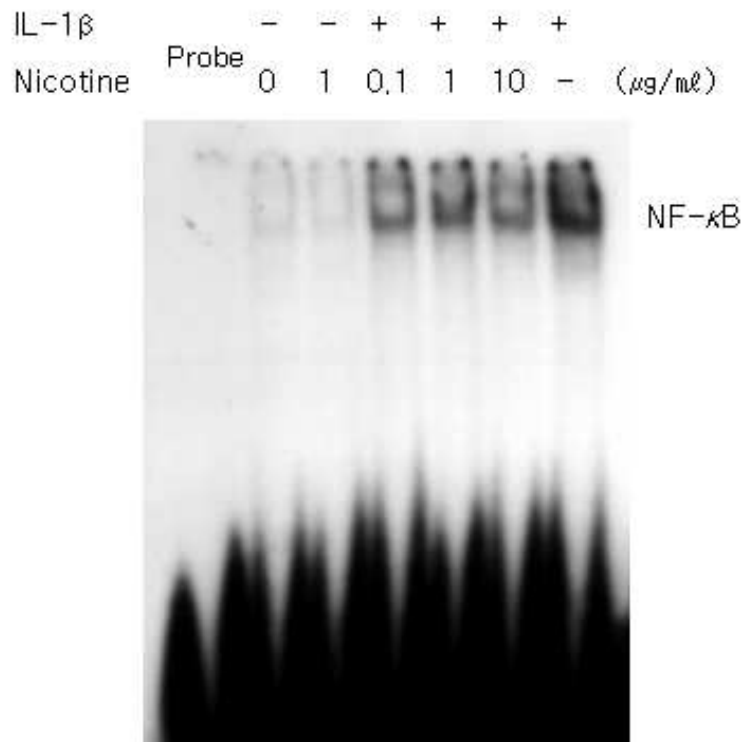


Figure 6. Effects of nicotine treatment on IL-1 β -induced NF- κ B activation. Electrophoretic mobility shift analysis of NF- κ B binding activity in nuclear protein extracts from IL-1 β activated, nicotine-pretreated human fetal astrocytes. Nuclear extracts were incubated with 32 P-end-labeled NF- κ B consensus oligonucleotide in binding reactions. The binding complexes were analyzed on nondenaturing polyacrylamide gels in 0.25 x TBE and visualized by autoradiography.

IV. 고 찰

니코틴은 15세기 스페인 주재 불란서 대사 Jean Nicot의 이름에서 명명된 것으로 특유하고 복합적인 약리작용을 갖고 있는 화학물질이다.²⁷ 무색, 유성 알카로이드 액체로 천연 담배 잎에만 존재하는 화학물질이다. 니코틴의 유해성에 대해서는 잘 알려져 있으며, 아편과 같은 수준의 습관성 중독을 일으키기 때문에 화학적으로 마약으로 분류되고 있는 물질이다. 니코틴은 흡수는 대부분 흡입을 통해 폐로 흡수되어 수초 내에 뇌에 약리작용을 일으키며 위로 흡수된 니코틴은 대부분 간을 거치면서 제거되는데, 소화기계에도 작용하여 위양을 일으키고 내분비계 및 호흡기에도 나쁜 영향을 끼친다. 특히 니코틴은 말초혈관을 수축하며 맥박을 빠르게 하고 혈압을 높이며 콜레스테롤을 증가시켜 동맥경화증을 악화시킨다. 반면 니코틴은 지질의 동원력과 불포화지방산의 분해를 급격히 촉진하여 비만 조절에 효과를 나타내고, 사람의 뇌에 도달하면 도파민의 분비가 왕성해지는데 이 때문에 좋은 기분을 느끼게 되고, 각성 효과가 있어 글을 쓰거나 작업을 할 때 일시적으로 창의력을 향상시키기도 하며, 흥분시 일시적으로 진정시키는 효과도 있지만, 양이 많으면 신경을 마비시켜 환각 상태에까지 이르게 한다.²⁸

TNF- α 는 미생물 감염이나 종양이 발생하였을 때 활성화된 대식세포를 비롯하여 T 세포, 비만세포, 호중구, 내피세포, 신경교세포 등에서 생성되어 면역반응과 염증반응을 유도하는 염증매개 사이토카인이며, 미생물 감염으로 생성된 TNF- α 는 부착인자의 발현증가, 대식세포의 사이토카인 분비증가 등을 유도하여 미생물에 대한 방어기전에 중요한 역할을 한다.²⁹ 또한 종양 발생시 apoptosis를 유도하여 종양발생의 감시기전으로 작용하기도 한다.³⁰ 그러나 많은 양의 TNF- α 가 분비되면 심근의 수축력 감소, 혈압강하, 대사과정 손상 등과 같은 일련의 반응을 일으켜 숙주에게 패혈성쇼크(septic shock)를 유발하기도 하며,³¹ 이러한 이유로 최근 TNF- α 의 발현 저해제와 그 기작에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

TNF- α 는 뇌를 포함한 다양한 조직에서 염증 반응의 중요한 매개자로서 myelin과 회돌기교세포(oligodendrocyte)에 작용을 해서 다발성경화증(multiple sclerosis;MS)과 알레르기성뇌척수염(allergic encephalomyelitis; EAE)에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.³²⁻³⁴ TNF- α 는 이들 세포의 증식을 유도하고 MS와 연계해 신경교증(gliosis)을 일으키는 다중 효과가 있으며 정상세포에 의한 M-CSF, G-CSF, GM-CSF, IL-6, TNF- α 의 잠재적 유도자이다.³⁵ 포유동물에서 TNF- α 의 발현은 세포용해

(cytolysis), 세포독성, 면역조절, 세포증식, 항바이러스 반응을 포함한 생물학적 기능을 가지고 있으며,^{36,37} 포유동물의 중추신경계에서 TNF- α 는 회돌기교세포의 apoptotic death를 유발하는 것으로 알려져 있다.³⁸ 최근 신경교세포인 성상세포와 소교세포(microglia)에서의 TNF- α 의 발현이 서로 다른 자극에 의해 유도됨이 보고되었으며 이는 신경교세포에서 생산되는 염증 매개 사이토카인이 뇌에서 공간적, 시간적으로 제한되어 있으며, 염증 매개자의 위치에 따른 생산을 저해하고 제한하는 조절 과정이 존재함을 의미한다.³⁹

신경교세포들은 중추신경계 내에서 면역반응에 관여하는 물질들을 분비하고 조절함으로써 염증과정 및 방어기전에 참여하는데, 이중 성상세포는 소교세포, 회돌기교세포와 함께 중추신경계를 구성하는 신경교세포로 중추신경계에서 가장 수가 많으며, 다른 조직에 비해 결합조직이 적은 중추신경계를 물리적으로 지지하고 혈관내피세포와 함께 뇌혈관장벽(blood-brain-barrier;BBB)을 구성하여 약물과 대사물질의 중추신경계로의 이동을 조절한다. 성상세포는 여러 가지 자극이 있는 상황에서 MHC class II 분자를 발현하여 항원 전달세포로 작용하거나 염증매개 사이토카인과 신경 성장인자를 생성하고 분비 할 수 있어 중추신경계의 주된 면역세포로 알려진 소교세포와 함께 면역반응에 참여할 것으로 생각되고 있는데, lipopolysaccharide (LPS), IL-1 β , interferon- γ (IFN- γ)와 같은 다양한 자극에 반응하여 TNF- α 를 생산하는 중추신경계 염증 반응의 중요 인자로 알려져 있으며, 회소돌기세포의 생존과 형성과정을 촉진하는 섬유아세포 성장인자의 주요 공급원이다.³⁹ Downen 등⁴⁰은 사람 태아의 성상세포에서 IL-1 β /IFN- γ 로 유도된 TNF- α 가 잠재적인 신경 유해 자극인자가 될 수 있으며, 내부에서 만들어진 TNF- α 가 IL-1으로 유도된 독성의 초기 매개자로 작용할 수 있다고 보고하였다. 뇌허혈이나 외상과 같은 중추신경계 손상이 있을 때 TNF- α 가 신경원 세포내 칼슘의 농도를 일정하게 유지하게 하여 신경원의 손상을 막거나 혹은 NF- κ B의 활성화를 통하여 Bcl-2, Bcl-x 발현을 증가시켜서 신경원세포를 보호한다.⁴¹ 이러한 결과를 볼 때 중추신경계에서 TNF- α 는 손상의 원인에 따라 숙주에 이롭거나 혹은 해로운 작용을 모두 할 수 있으므로 질병에 따라 다른 치료 전략이 필요하다.

본 실험은 니코틴을 처리하여 사람 태아 성상세포에서 IL-1 β 로 유도된 TNF- α 의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 TNF- α mRNA 수준에서의 발현정도를 비교하였다. 먼저 정상 사람 성상세포에서는 TNF- α 의 발현이 극히 미약하므로 TNF- α 의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있는 IL-1 β 를⁴² 처리하여 TNF- α mRNA의 발현을 유도한 후 시간별 발현농도를 비교하였다. 사이토카인을 처리하지 않은 그룹에서는 TNF- α mRNA가 거의 발현되지 않았으나, TNF- α 를 유도하는 것으로 알려져 있는 IL-1 β 처리 군에서는 시간별로 다른 발현양상을 보여 주었다. TNF- α mRNA는 IL-1 β 처리 이후 점점 발현이

증가하여 2시간째에 가장 많은 발현을 나타냈으며, 이후부터 서서히 발현양이 줄어드는 것을 확인하였다. 따라서 일차 배양된 사람 태아의 정상세포에서 TNF- α mRNA가 시간에 따라 mRNA의 발현양상이 다르게 나타남을 확인할 수 있었다. 니코틴의 처리 농도에 따라서 발현양상의 변화를 확인하기 위해 니코틴을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 일차 배양된 태아의 정상세포에 처리한 다음 IL-1 β 를 100 pg/ml의 농도로 첨가하여 시간별로 RNA를 분리해 RT-PCR을 수행하였다. 니코틴을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 후 IL-1 β 를 100 pg/ml로 자극한 군에서는 IL-1 β 단독 처리군에 비해 TNF- α 의 발현이 감소하는 양상을 보이는 것을 확인할 수 있었으며 이는 니코틴의 전처리가 TNF- α 발현을 저해하는 역할을 하는 것임을 의미한다. 시간별로는 니코틴을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리시에는 8시간째까지는 IL-1 β 처리 군에 비해 큰 차이를 보이지 않았으나 8시간 이후부터 TNF- α mRNA의 발현이 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 니코틴을 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시에는 24시간 처리시에 현저한 감소를 나타내 처리되는 니코틴의 농도에 따라 IL-1 β 에 의해 유도되는 TNF- α 의 발현을 억제하는 작용 시간이 달라짐을 확인할 수 있었다. 반면 니코틴을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 1차 배양된 사람의 정상세포에 처리한 후 100 pg/ml의 IL-1 β 로 자극한 군에서는 IL-1 β 단독으로 처리하여 유도된 TNF- α mRNA와 비교하여 TNF- α mRNA의 발현이 약간 감소하긴 하나 현저한 변화를 관찰할 수 없었다. 이는 니코틴의 세포 독성이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 나타나므로 독성효과에 의해서 TNF- α 의 발현 억제 효과가 가려져있을 가능성이 있다.

기존 연구에 의하여 단백질 합성을 억제하면 세포들이 TNF- α 에 의해 더 잘 죽는다는 사실이 발견되었다.⁴³ 이와 같은 발견에 따라 TNF- α 의 작용을 억제하는 단백질이 있을 것이라고 추정되었고, 많은 연구자들은 TNF- α 에 의해 활성화되는 NF- κ B가 바로 그러한 역할을 한다고 주장하고 있고,⁴⁴ 일반적으로 transcription factor인 NF- κ B는 다양한 염증 관련인자들을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁴⁵ NF- κ B는 활성산소나 자외선과 같은 스트레스가 있는 상황이나 LPS, double stranded RNA와 같은 미생물성분, IL-1 β , TNF- α 와 같은 사이토카인에 의해 활성화되며, 그 결과 angiotensinogen이나 보체, 아밀로이드 단백질과 같은 acute phase response protein을 생성하여 염증 반응을 진행시키거나, 혈관세포부착인자-1(vascular cell adhesion molecule-1), 세포부착인자-1(intercellular adhesion molecule-1)과 같은 부착인자의 발현을 증가시켜 세포 이동과 재생에 관여하며, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α , TNF- β , IFN- β 와 같은 사이토카인의 분비를 촉진하여 면역세포들의 활성화하는 기능을 가지고 있다.⁴⁶ TNF- α 의 신호조절의 결과 중에서 많은 부분이 NF- κ B를 활성화하여 일어나며, 활성화된 NF- κ B는 apoptosis를 억제할 수 있는 분자를 합성하도록 하여 세포를 보호한다.^{47,48}

Naoyuki 등⁴⁹은 니코틴이 U937 세포에서 NF- κ B의 조절을 통해 염증매개 인자의 생성을 억제한다는 연구결과를 보고하였다. 이와 마찬가지로 본 실험에서도 사람 태아 성상세포에 니코틴을 전처리시 IL-1 β 에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 니코틴 전처리시 IL-1 β 에 의해 유도되는 TNF- α mRNA의 발현이 감소하는 결과와 비교하여 니코틴이 NF- κ B의 활성을 감소시켜 결과적으로 TNF- α mRNA의 발현을 억제한다는 것을 뒷받침한다. 그러나 니코틴이 이외에도 니코틴성콜린성수용체 부위에 작용했을 가능성도 있고, NF- κ B에 의한 전사이후의 과정에 작용하여 TNF- α mRNA의 발현을 억제할 수 있으므로 추후 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다. 본 연구에서는 TNF- α mRNA를 측정하여 TNF- α 단백질 발현을 보았지만 mRNA의 발현을 측정함으로써 단백질의 발현을 예측할 수 있었다.

신경교세포인 성상세포와 소교세포(microglia)에서의 TNF- α 단백질 발현양을 비교한 연구 결과에 따르면 무자극 군에서는 두 세포 모두 TNF- α 가 발현되지 않았으며, IL-1 β 와 LPS로 자극한 후 발현양을 비교한 결과 성상세포에서는 IL-1 β 에 의해 자극된 군에서는 TNF- α 의 양이 증가한 반면 LPS 자극 군에서는 변화가 없었다. 이와는 대조적으로 소교세포에서는 LPS에 의해서 TNF- α 의 발현이 증가되고 IL-1 β 에 의해서는 변화되지 않는 결과를 나타냈으며 시간에 따라 다른 발현 양상이 나타나는 것을 알 수 있었다.⁵⁰ 따라 소교세포는 회돌기교세포, 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.

V. 결 론

본 연구에서는 중추신경계의 여러 면역반응 매개질환의 병태생리에 대한 이해를 넓히고자, 이미 알려진 니코틴의 cytokine 생성억제가 중추신경계의 정상세포에서도 일어남을 확인하고 그 억제기전을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 사람 태아 정상세포에 다양한 농도의 니코틴과 IL-1 β 를 처리한 다음 TNF- α mRNA의 발현 정도와 NF- κ B의 활성을 비교, 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 사람 태아 정상세포를 0.1-20 μ g/ml의 니코틴으로 처리해 본 결과 10 μ g/ml 이상의 농도에서 세포독성능이 나타나기 시작하였다.

2. 사람 태아 정상세포에 IL-1 β 를 처리하면 2시간만에 TNF- α mRNA가 최대로 발현되었으며 그 이후로는 점진적으로 감소하였다.

3. 사람 태아 정상세포를 1 및 0.1 μ g/ml의 니코틴으로 전처리한 후 IL-1 β 로 자극한 군에서는 IL-1 β 단독 처리군에 비해 TNF- α mRNA의 발현이 감소하는 양상을 보였다. 1 μ g/ml의 니코틴을 처리한 경우에는 8시간 이후부터 TNF- α mRNA의 발현이 현저하게 감소하여 12시간에 최대로 감소하였다. 또한 0.1 μ g/ml의 니코틴을 처리한 군에서는 24시간에 가장 현저하게 감소하였다.

4. 정상세포에 IL-1 β 만 처리한 군에서는 강력한 NF- κ B의 활성을 확인할 수 있었으며, 니코틴을 전처리하고 IL-1 β 로 자극한 군에서는 NF- κ B의 활성이 감소하였다. 결론적으로 일정농도 이상의 니코틴은 세포독성효과를 나타내나 적절한 농도의 니코틴은 정상세포에서 IL-1 β 에 의해 유도되는 TNF- α 의 발현 감소를 유도하며, 이는 NF- κ B의 활성을 감소시킴으로써 나타난다고 생각된다. 이러한 연구결과는 감염성 및 면역성 뇌신경질환의 치료와 TNF- α 의 저해제 개발에 대한 학문적 배경을 제공할 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Holt PG, Keast D. Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals. *Bacteriol Rev* 1977; 41:205-216
2. Holt PG. Immune and inflammatory function in cigarette smokers. *Thorax* 1987;42:241-249
3. Johnson JD, Houchens DP, Kluwe WM, et al. Effects of mainstream and environmental tobacco smoke on the immune system in animals and humans: a review *Crit Rev Toxicol* 1990;20:369-395
4. Ross RK, Pike MC, Vessey MP, et al. Risk Factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. *BMJ* 1986; 293: 359-61
5. Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, et al. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA* 1986; 255: 1904-8
6. Baron JA. Cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology* 1986; 36: 1490-6
7. Gorell JM, Rybicki BA, Johnson CC, et al. Smoking and Parkinson's disease; a dose-response relationship. *Neurology* 1999; 52: 115-9
8. Breteler MMB, Claus JJ, van Duijn CM, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease. *Epidemiol Rev* 1992; 14: 59-82
9. Shapiro S, Olson DL, Chellemi SJ. The association between smoking and aphthous ulcers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970; 30: 624-30
10. Axell T, Henricsson V. Association between recurrent aphthous ulcers and tobacco habits. *Scand J Dent Res* 1985; 93: 239-42
11. Grady D, Ernster VL, Stillman L, et al. Smokeless tobacco use prevent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74: 463-5
12. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 1841-54
13. De Castella H. Non-smoking: a feature of ulcerative colitis (letter). *BMJ* 1982; 284: 1706
14. Lashner BA, Hanauer SB, Sliverstein MD. Testing nicotine gum for ulcerative colitis patients. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 827-32
15. Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, et al. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Eng J Med* 1994; 330: 811-5
16. Thomas GAO, Rhodes J, Mani V, et al. Transdermal nicotine as maintenance therapy for

- ulcerative colitis. *N Eng J Med* 1995; 332: 988-92
17. Zijlstra FJ, Srivastava ED, Rhodes M, et al. Effect of nicotine on rectal mucus and mucosal eicosanoids. *Gut* 1994; 35: 247-51
 18. Motley RJ, Rhodes J, Williams G et al. Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis. *J Pharm Pharmacol* 1990; 42: 288-9
 19. van Dijk AP. Transdermal nicotine inhibits interleukin 2 synthesis by mononuclear cells derived from healthy volunteers. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 664-71
 20. Madretsma GS, Donze GJ, van Dijk AP, et al. Nicotine inhibits the in vitro production of interleukin 2 and tumor necrosis factor-alpha by human mononuclear cells. *Immunopharmacology* 1996; 35: 47-51
 21. Hong Wang, Man Yu, Mahendar Ochani, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384-8
 22. Sugano N, Shimada K, Ito K, et al. Nicotine inhibits the production of inflammatory mediators in U937 cells through modulation of nuclear factor-kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 25-8
 23. Baron JA. Beneficial effects of nicotine and cigarette smoking: the real, the possible and the spurious. *Br Med Bull* 1996; 52: 58-73
 24. 박주영, 류혜명, 최선주, 박현숙, 고춘명, 이성수: 사람 정상세포의 시험관내 배양 및 특성. *J Bacteriol Virol* 2001; 31: 39-45
 25. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl Acids Res* 1983; 11: 1475-89
 26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54
 27. Haas LF. Jean Nicot(1530-1600). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55:430.
 28. 장준. 금연의 약물요법. *대한의사협회지* 2006;49:272-278
 29. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, et al. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today* 1997; 18: 487-492
 30. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991; 266: 7313-7316
 31. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 625-655
 32. Prineas JW, Wright RG. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular

- compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest* 1978; 38: 409-421
33. Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. Multiple sclerosis. distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol* 1983; 4: 201-221
34. Raine CS. Biology of disease. Analysis of autoimmune demyelination: its impact upon multiple sclerosis. *Lab Invest* 1984; 50: 608-635
35. Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol* 1992; 263: C1-C16
36. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 411-452
37. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanism of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991; 266: 7313-6
38. Selmaj K, Raine CS, Cross AH. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann Neurol* 1991; 30: 694-700
39. Oh LY, Yong VW. Astrocytes promote process outgrowth by adult human oligodendrocytes in vitro through interaction between bFGF and astrocyte extracellular matrix. *Glia* 1996; 17: 237-253
40. Downen M, Amaral TD, Hua LL, et al. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: role of tumor necrosis factor- α . *Glia* 1999; 28: 114-127
41. Lee YB, Schrader JW, Kim SU. p38 map kinase regulates TNF- α production in human astrocytes and microglia by multiple mechanisms. *Cytokine* 2000; 12: 874-880
42. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* 1996; 274: 784-7
43. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 1996; 274: 782-784
44. Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, et al. Tumor Necrosis Factor Induces Bcl-2 and Bcl-x Expression through NF- κ B Activation in Primary Hippocampal Neurons. *J Biol Chem* 1999; 274: 8531-8538
45. Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B protein: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683
46. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and REL proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-60
47. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α induced cell

death. Science 1996; 274: 782-4

48. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, et al. Suppression of TNF- α induced apoptosis by NF- κ B. Science 1996; 274: 787-9

49. Naoyuki S, Koichi S, Koichi I, et al. Nicotine inhibits the production of inflammatory mediators in U937 cells through modulation of nuclear Factor- κ B activation. Biochem Biophys Res Commun 1998; 252: 25-8

50. Benveniste EN, Tang LP, Law RM. Differential regulation of astrocyte TNF- α expression by the cytokines TGF- β , IL-6 and IL-10. Int J Dev Neurosci 1995; 13: 341-349

ABSTRACT

The Inhibitory Effect of Nicotine on TNF- α Expression in Human Fetal Astrocytes

Il Hong Son

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Sung Soo Lee)

The Tumor necrosis factor- α , (TNF- α), is involved in the pathogenesis of multiple sclerosis and contributes to the degeneration of oligodendrocytes as well as neurons. TNF- α is produced by microglia and astrocytes; microglia and astrocytes also produce hormones and cytokines that influence their biological activity. Nicotine has been found to have powerful immunosuppressive and inflammation-suppressing effects. Astrocytes, the major glial cells in the CNS, are capable of producing TNF- α at both the mRNA and protein levels in response to interleukin-1 (IL-1) or TNF- α .

Nicotine have been shown to influence glial cell function. To order to explore the role of astrocytes in the production of TNF- α , astrocytes were pretreated with nicotine and are stimulated with IL-1 β to determine their effects on TNF- α production.

The results are as follows.

1. Cytotoxic effects of nicotine on human fetal astrocytes were noted above 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of nicotine.
2. The effect of IL-1 β on TNF- α mRNA expression in primary cultured human fetal astrocytes was maximal at 2 h after IL-1 β (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment.
3. Human fetal astrocytes were pretreated with 0.1, 1, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of nicotine and then stimulated with IL-1 β (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 2 h. The inhibitory effect of

nicotine on expressions of TNF- α mRNA in human fetal astrocytes with pretreated 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicotine are first noted at 8 hr, and the inhibitory effect is maximal at 12 h. The inhibitory effect at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of nicotine is inhibited maximal at 24 h.

4. Nicotine at 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations significantly inhibits IL-1 β -induced NF- κ B activation.

Collectively, this study indicates that nicotine might inhibit the expression of TNF- α in activated human fetal astrocytes.

Key words : TNF- α , Human fetal astrocytes, nicotine, NF- κ B