

흡연성분 중 Nicotine, Cotinine, Benzopyrene이 인체 기관지 상피세포에서 항산화제의 발현에 미치는 영향

¹한양대학교 의과대학 내과학교실, ²생화학분자생물학교실

김용석², 이재형¹, 김상현¹, 김태형¹, 손장원¹, 윤호주¹, 박성수¹, 신동호¹

Effects of Nicotine, Cotinine and Benzopyrene as Smoke Components on the Expression of Antioxidants in Human Bronchial Epithelial Cells

Yong Seok Kim, M.D.², Jae Hyung Lee, M.D.¹, Sang Heon Kim, M.D.¹, Tae Hyung Kim, M.D.¹, Jang Won Sohn, M.D.¹, Ho Joo Yoon, M.D.¹, Sung Soo Park, M.D.¹, Dong Ho Shin, M.D.¹

¹Department of Internal Medicine, ²Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Background: Cigarette smoking is an important risk factor for chronic bronchitis and COPD. Airway epithelial cells exposed to cigarette smoke components such as nicotine, cotinine and benzopyrene can generate reactive oxygen species (ROS) and be subject to oxidative stress. This oxidative stress can induce the inflammatory response in the lung by the oxidant itself or by the release of proinflammatory cytokines. It has been reported that nicotine stimulates ROS, which are associated with NF- κ B.

Methods: Beas2B cells were treated with nicotine, cotinine and benzopyrene. RT-PCR was used to measure the expression of several antioxidant factors using the total RNA from the Beas2B cells. The level of superoxide dismutase(CuZnSOD), thioredoxin, glutathione reductase expression was examined.

Results: 0.5 to 4 hours after the benzopyrene, nicotine and cotinine treatments, the level of thioredoxin and glutathione reductase expression decreased. Longer exposure to these compounds for 24 to 72 hours inhibited the expression of most of these antioxidant factors.

Conclusion: During exposure to smoke compounds, thioredoxin and glutathione reductase are the key antioxidant factors induced sensitively between 0.5 and 4 hours but the levels these antioxidants decrease between 24 hour and 72hours. (*Tuberc Respir Dis* 2007; 62: 197-202)

Key Words: Beas2B cell, Benzopyrene, Nicotine, Cotinine, Antioxidants.

서론

담배 연기는 4700개 이상의 화학물질로 이루어져 있으며, 유리기(free radical) 등의 산화제가 고농도로 포함되어 있다^{1,2}. 이러한 산화제 물질들은 강한 산화 자극을 유발하며, 폐에 염증세포의 모집과 활성화를 초래하고 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 과 활성질소(reactive nitrogen species, RNS) 등의 독

성대사물질을 생성한다³. 흡연으로 발생하는 산화제와 항산화제의 불균형은 만성폐쇄성폐질환 등의 다양한 질환과 연관성이 있는 것으로 알려져 있다⁴.

최근 흡연물질 중 nicotine이 활성산소의 생산을 증가시키며, 이 과정에는 NF- κ B가 관여한다는 보고들이 있었으나^{5,6}, 아직 각각의 흡연물질들과 항산화제의 발현과의 시간적 연관성에 대한 구체적인 실험결과가 보고된 바 없다.

본 연구는 기관지상피세포에 대표적인 흡연물질인 benzopyrene, nicotine과 cotinine에 각각 노출되었을 때 항산화제인 CuZnSOD, thioredoxin 과 glutathione reductase들의 유전자가 시간에 따라 발현되는 변화를 분석하고, 이 기전에 항산화효소의 조절기능에 중요한 전사인자로 알려진 NF- κ B의 관여여부를 확인하고자 하였다.

Address for correspondence: **Dong Ho Shin, M.D.**
Division of Pulmonology, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hanyang University 17 Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul, Korea.
Tel: 82-2-2290-8348, Fax: 82-2-2298-9183
E-mail: shindh@hanyang.ac.kr
Received: Dec. 11. 2006
Accepted: Jan. 26. 2007

대상 및 방법

Cell culture and treatment with benzopyrene, nicotine and cotinine

인체 기관지 상피세포주인 Beas2B세포(ATCC, USA)를 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin을 함유한 RPMI1640 배양액 (Invitrogen, USA) 을 사용하여 배양하였다. Beas2B세포의 흡연물질 처리를 위하여 100 mm 세포배양 판에서 8 ml의 배양액당 benzopyrene(Sigma, USA), nicotine(Sigma, USA), cotinine(Sigma, USA) 각각의 농도가 150 nM, 10 mM, 10 mM이 되도록 이들 물질을 첨가하였다.

Quantitative analysis of the expression of antioxidant factors

Benzopyrene, nicotine 또는 cotinine으로 각각 처리한 Beas2B세포에서 항산화제의 발현 정도를 비교 분석하기 위하여, 각 흡연물질 처리 후 30분, 1시간, 4시간, 24시간, 48시간, 72시간에 Beas2B세포로부터 Trizol(Invitrogen, USA)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. RNA(3 µg)를 Superscript II RT (Invitrogen, USA), Oligo(dT)12-18(0.5 µg/µl) 및 Random hexamers(50 ng/µl)와 함께 제조사의 실험방법 (GIBCO BRL, Cat. No. 11904-018)에 따라 역전사하였다. 이 과정으로부터 생성된 cDNA를 유전자증폭반응의 template로 사용하여 Cu/Zn Superoxide dismutase(genebank ID=36541), thioredoxine (genebank ID= 50592993), glutathione reductase (genebank ID=

31824) 와 GAPDH(Genebank ID: 53734501)의 coding sequence절편 일부들을 증폭하였다(Table 1). 이 증폭과정은 Techgene thermal cycler(Techn, UK)를 이용하였으며 20 µl의 유전자 증폭반응액은 3 µl의 cDNA, 5.2 µl의 5M betaine (Sigma, USA), 0.5 µl의 DMSO(Sigma, USA), 0.3 µl의 Taq polymerase(5 unit/ul, TAKARA EX Taq) 등으로 조성되었다. 유전자증폭반응 조건은 denaturation, annealing 및 extension을 각기 98°C에서 10초, 60°C(최초온도)와 50°C(최종온도)사이의 touchdown방법으로 30초, 7 2°C에서 1분씩 총 30회를 시행하였다.

유전자 증폭반응의 결과는 상기한 유전자증폭반응 시료 10 µl씩을 1% agarose gel 전기영동으로 분석한 뒤, gel documentation system으로 촬영하고 각 DNA band의 밀도를 Quantity One프로그램 (version 4.6.2, BioRad, USA)으로 측정하였다.

NF-κB reporter assay with A549 and Beas2B cells which were treated by benzopyrene, nicotine and cotinine

인체 기관지 상피 세포주인 Beas2B를 대상으로 NF-κB reporter-유전자(Clontech, USA)를 lipofectin (Invitrogen, USA)을 이용하여 transfection시 대상세포 1.4x10⁵개를 six well 배양판의 배양액 2 ml씩에 풀어 배양하였다. 배양세포의 밀도가 50%에 도달하였을 때 새로운 배양액으로 교체하고 37°C의 CO₂배양기에 두었다가 1시간 뒤에 transfection과정을 시행하였다. Transfection에 사용할 DNA는 1µg농도로 Opti-MEM reduced serum medium(Invitrogen,

Table1. Primers for RT PCR of antioxidants and oxidants from Beas2B cell

Cu/Zn Superoxide dismutase(genebank ID=36541) CDS-nt* 47	5' AGGGCATCATCAATTCGAG 3'(forward)
Cu/Zn Superoxide dismutase (genebank ID=36541) CDS-nt* 263	5' ACATTGCCCAAGTCTCCAAC 3'(reverse)
Thioredoxine(genebank ID=50592993) CDS- nt* 5	5' TGAAGCAGATCGAGAGCAAG 3'(forward)
Thioredoxine(genebank ID=50592993) CDS- nt* 278	5' TTGGCTCCAGAAAATTCACC 3'(reverse)
Glutathione Reductase(genebank ID= 31824) CDS- nt* 977	5' GCATCTATGCAGTTGGGGAT 3'(forward)
Glutathione Reductase(genebank ID= 31824) CDS- nt* 1409	5' GTAGGGTGAATGGCGACTGT 3'(reverse)
GAPDH(genebank ID=53734501) CDS-nt* 18	5' CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT 3'(forward)
GAPDH(genebank ID=53734501) CDS-nt*324	5' AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC 3'(reverse)

* CDS-nt: nucleotide number in coding sequence of the DNA

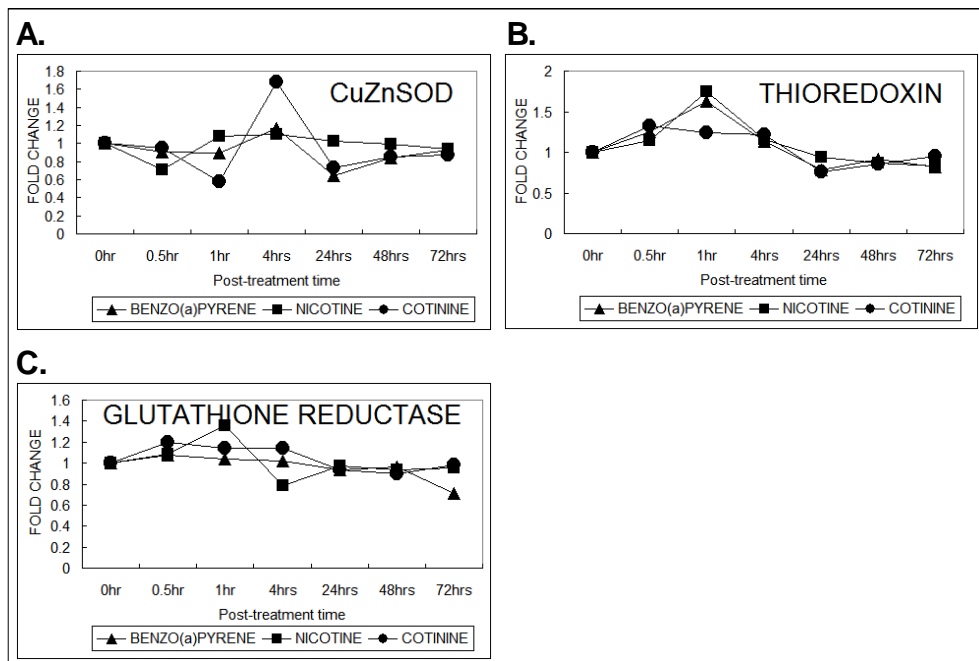


Figure 1. Expression of antioxidants of Beas2B cell treated with smoke components(benzopyrene, nicotine, cotinine) at 0.5, 1, 4, 24, 48, 72hrs post-treatment time. The expression level of CuZnSOD(A), thioredoxin(B), and glutathione reductase(C) as an intracellular antioxidants was analyzed after treatment of Beas2B cell with benzopyrene, nicotine, or cotinine. Those levels were determined as the PCR band intensities measured by Quantity One program(Bio-Rad).The fold change was calculated as the expression level of an antioxidant from Beas2B cell treated with a smoke component divided by the level of negative control(no treatment of smoke components) at individual post-treatment time.

USA) 100 μ l에 혼합하였다. 이후 lipofectin(Invitrogen, USA) 10 μ l를 Opti-MEM reduced serum medium(Invitrogen, USA) 100 μ l에 혼합하여 실온에 30분간 두었다. 이후 DNA용액과 lipofectin용액을 혼합하여 실온에서 15분간 두었다. 동시에 배양세포를 Opti-MEM reduced serum medium(Invitrogen사, USA)로 세척하였다. 마지막으로 Opti-MEM reduced serum medium(Invitrogen사, USA) 800 μ l를 DNA-lipofectin혼합액 200 μ l에 첨가하여 세포에 가하였다. 이후 37°C의 CO₂배양기에 5시간 동안 두었다가 serum함유 DMEM배양액 2 mL로 교환하여 48시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다.

이후 배양된 세포를 PBS용액으로 2회 세척하고 세포용해액 200 μ l씩을 가하여 -70°C에서 30분간 두었다. 이후 실온에서 녹인 후 cell scraper로 용해된 세포를 긁어 모아 얼음위의 microfuge관에 모았다.

3,000 xg에서 5분간 원심분리한 뒤 상청액을 새로운 microfuge관에 옮기고 96 well의 luminometer microwell plate에 한 well당 40 μ l를 가하였다. 이후 luciferase assay 시약A와 시약B (BD Pharmingen, USA)를 증류수 10 mL씩에 녹여서 Berthold microplate luminometer(Berthold Detection Systems, Germany)를 이용하여 luciferase activity를 측정하였다.

결 과

CuZnSOD의 생성은 benzopyrene, nicotine, cotinine을 처리한 지 30분 후 각각이 GAPDH에 비해 0.9배, 0.7배 및 0.9배이었으며, 1시간 후 0.89배, 1.08배, 0.58배, 4시간 후 1배, 1.1배 1.68배, 24시간 후 0.64배 1.03배, 0.73배, 48시간 후 0.84배, 0.99배, 0.85배, 72시간 후 0.93배, 0.94배, 0.88배이었다(Figure 1A, Figure 2).

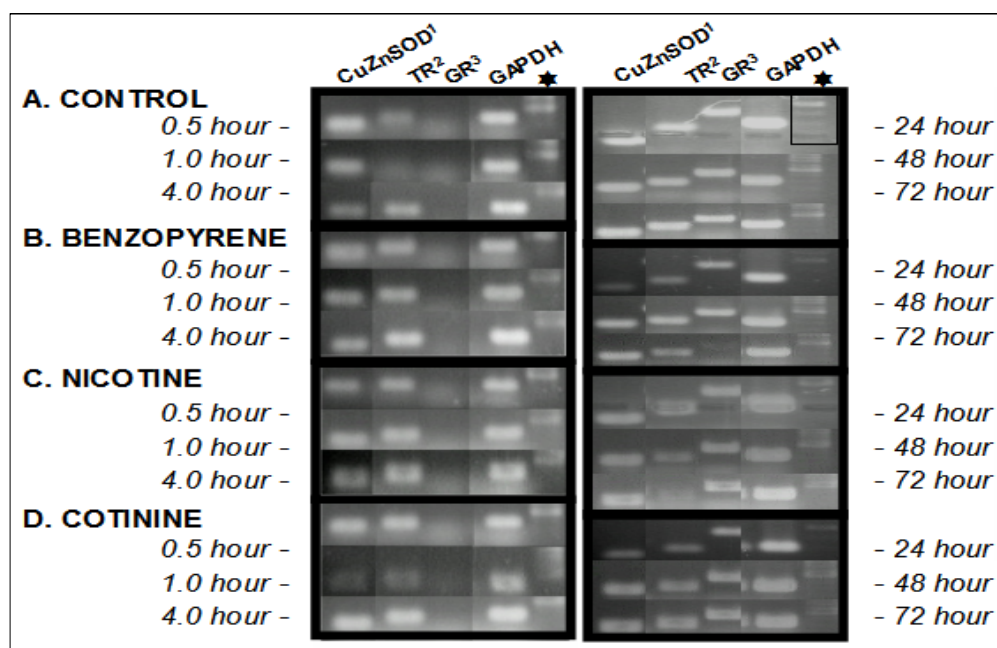


Figure 2. RT-PCR of antioxidants of Beas2B cell treated with smoke components. PCR results of cDNA from Beas2B cell with no treatment(A. CONTROL) or with 150nM BENZO(a)PYRENE(B. BENZOPYRENE) or with 10mM NICOTINE(C. NICOTINE) or with 10mM COTININE(D. COTININE) were taken at 0.5, 1, 4, 24, 48, 72 hrs post-treatment.
CuZnSOD1 - Cu/ZnSuperoxide Dismutase(217bp)
TR2 - Thioredoxin(274bp)
GR3 - Glutathione Reductase(433bp)
GAPDH(307bp)
★ Size marker(GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

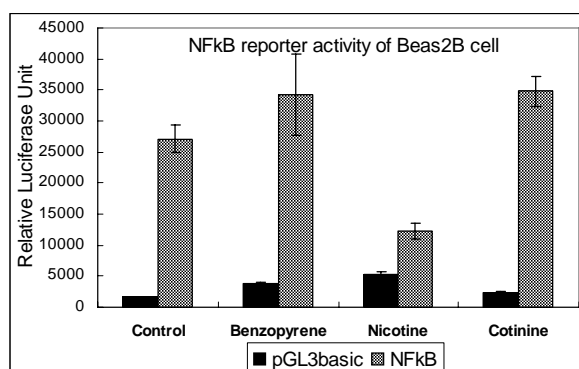


Figure 3. Effect of smoke components on NfκB reporter activity of respiratory tract cells
The regulatory mechanism of antioxidant by smoke component was investigated concerned with NF-κB activation. NfκB reporter DNA(Clontech ,USA) was transiently transfected into Beas2B cell with Lipofectin Reagent® (Invitrogen, USA) and Firefly luciferase assay was done. Cotinine and benzopyrene as smoke components stimulated the activity of NfκB reporter of Beas2B cell lines.

Thioredoxin의 생성은 benzopyrene, nicotine, cotinine을 처리한 지 30분 후 각각이 GAPDH에 비해 1.25배, 1.14배, 1.3배이었으며, 1시간 후 1.62배, 1.74배, 1.24배, 4시간 후 1배, 1.16배, 1.22배, 24시간 후 0.79배, 0.94배, 0.76배, 48시간 후 0.92배, 0.86배, 0.85배, 72시간 후 0.82배, 0.83배, 0.95배이었다(Figure 1B, Figure 2).

Glutathione reductase의 생성은 benzopyrene, nicotine, cotinine을 처리한 지 30분 후 각각이 GAPDH에 비해 1.07배, 1.09배, 1.2배이었으며, 1시간 후 1.04배, 1.36배, 1.14배, 4시간 후 1배, 0.78배, 1.14배, 24시간 후 0.93배, 0.97배, 0.94배, 48시간 후 0.96배, 0.93배, 0.9배, 72시간 후 0.71배, 0.95배, 0.98배이었다(Figure 1C, Figure 2).

Beas2B세포에서 benzopyrene 및 cotinine에 의해 NF-κB reporter의 활성도가 대조군에 비해 증가되었

지만, nicotine에 의한 증가소견은 관찰할 수 없었다 (Figure 3).

고 찰

흡연물질 중 benzopyrene은 발암물질로 알려져 있는 동시에 항산화기전의 억제효과에 의해 혈관에 동맥경화증을 초래하는 기전이 보고된 바 있다⁸. Nicotine은 세포내 전사인자인 NF- κ B를 활성화시키며 활성산소 생산을 증가시키는 것으로 보고되어 있으며^{5,6}, nicotine의 인체 대사 산물인 cotinine은 인체내 반감기가 최대 20시간 정도로 유지되므로 nicotine 자체보다 인체내 잔류시간이 훨씬 길다. 항산화기전에 대한 역할 또한 nicotine 자체보다 강력할 것으로 판단되는데 cotinine은 nicotine과 함께 세포내 수산화기(OH) 발생을 촉진시킨다고 보고되어 있다^{9,10}. 혈중 항산화인자인 비타민 C, E 등과 beta-carotene 등의 혈중 농도는 혈중 cotinine 농도와 역비례관계를 갖는데 흡연정도가 심할수록 혈중 cotinine 농도는 높고, 항산화인자의 혈중 농도는 낮게 나타난다¹⁰.

CuZnSOD는 폐조직을 산화력으로부터 방어하는 superoxide dismutase(SOD) 종류 중 mitochondrial SOD와 함께 세포 내 SOD 농도를 유지하는 항산화효소로서 폐조직의 염증반응시에 농도가 증가되며 천식 환자의 경우 폐조직에서 그 농도가 감소되어 있는 것으로 보고되어 있다¹¹⁻¹⁴. 본 연구에서 benzopyrene, nicotine 그리고 cotinine을 처리 한 후 경과시간 별 항산화인자의 변화는 일정하게 감소 또는 증가되는 경향을 보이지 않았다. 즉, CuZnSOD의 경우 benzopyrene에 노출된 Beas2B세포로부터 경과시간별로 30분과 1시간까지는 감소되었다가 4시간에는 정상화되었고 24시간 경과 시 가장 현저히 감소되었으며 48시간과 72시간 경과 시까지 감소된 상태가 유지되었다. 그러나 nicotine을 처리한 경우 CuZnSOD는 30분 경과 시 가장 현저히 감소되었다가 48시간까지는 약간 증가되거나 정상 수준을 유지하였다. Cotinine을 처리한 경우 CuZnSOD는 1시간 경과 시에 가장 현저히 감소되었다가 4시간 경과 시 가장 현저히 증가되었으며 그 외 경과시간에는 감소된 수준을 유지하였다. 이

상의 결과를 종합하여 보면 CuZnSOD는 Beas2B세포에서 benzopyrene 및 cotinine에 의해 일부 경과시간에 따른 발현량의 변동이 보였지만, 30분으로부터 72시간에 이르기까지 전반적으로 감소되는 것으로 보여, CuZnSOD는 흡연물질에 의해 억제 되는 것으로 해석된다.

Thioredoxin은 유핵세포와 무핵세포 모두에서 존재하며 세포의 산화환원반응에 핵심역할을 갖는 단백질로^{3,15}, 흡연물질에 노출된 세포에서 그 발현량이 증가된다고 보고되어 있으며³ 폐조직의 염증반응을 억제하는 역할을 갖는 것으로 보고되어 있다¹⁴. 본 연구 결과에서는 benzopyrene, nicotine, cotinine을 처리한 후 기존의 보고내용과 일치하게 30분부터 4시간에 이르기까지 thioredoxin 발현량은 증가되었으나, 경과시간 24시간부터 72시간에 이르는 장시간의 경과시간에서는 그 발현량이 감소되었다.

Glutathione reductase의 경우 흡연자의 적혈구에서 그 발현량이 증가된 것으로 보고된 바 있으며¹⁶, 본 연구에서는 thioredoxin의 경우와 비슷하게 benzopyrene, nicotine, cotinine을 처리한 후 30분부터 4시간에 이르기까지는 발현량이 증가 되었으나, 24시간부터 72시간에 이르는 장기간의 경과시간대에는 그 발현량이 감소되어 관찰되었다.

기관지 세포들이 흡연물질에 노출 시 어떠한 신호 전달기전에 의해 항산화제의 발현 변화를 일으키는지는 구체적으로 규명된 바 없지만, 세포핵 전사인자인 NF- κ B가 관여할 것이라는 보고가 있고^{5,6}, 본 연구에서도 Beas2B세포에서 benzopyrene 및 cotinine에 의한 NF- κ B 발현량의 증가 가능성을 확인하였다. 그러나, nicotine은 기존의 실험결과들과는 달리 NF- κ B의 발현을 증가시키지 않았다. 이는 nicotine의 처리농도나 처리시간 등의, 실험조건 차이 또는 기존보고와 달리 nicotine이 NF κ B 발현에 영향을 끼치지 않았을 가능성을 의미하는 것으로서 추후 연구를 통해 확인하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서는 흡연물질인 benzopyrene, nicotine 및 cotinine 등에 의해 처리된 기관지상피세포인 Beas2B세포에서 CuZnSOD, thioredoxin, glutathione reductase 등의 항산화제 발현량이 처리

후 경과시간 별로 증감되는 것을 확인하였다. 즉, thioredoxin과 glutathione reductase의 경우는 처리 후 4시간 이내의 초기 노출시간에는 증가하는 양상을 보였지만, 흡연물질 처리후 24시간 이상 경과시에는 CuZnSOD, thioredoxin, glutathione reductase 3가지 모두의 발현량이 억제되는 것을 확인하였다. 이상의 소견을 종합하여 보면 흡연에 의한 폐조직 손상은 독성 흡연물질에 노출 후 초기 급성기에 일어나는 손상 뿐 아니라, 24시간 이상 장시간동안 노출되었을 경우엔 항산화제들의 억제로 인한, 산화제와 항산화제의 불균형이 유발되면서 발생할 것이라고 사료된다.

요 약

흡연물질로서 benzopyrene, nicotine 및 cotinine 등은 기관지상피세포인 Beas2B에서 CuZnSOD, thioredoxin, glutathione reductase 등의 발현량에 영향을 주며 특히 thioredoxin 및 glutathione reductase의 발현량을 노출 후 30분에서 4시간 경과 시간대에 증가시켰다가 24시간 이후에는 억제하는 특징을 나타내었다. 상기한 흡연물질에 의한 항산화효소의 조절기전에는 전사인자인 NF- κ B가 관여하는 것으로 추정되었다.

감사의 글

본 연구는 한양대학교 1999년 교내연구비의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

참 고 문 헌

1. Church T, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985;64:111-26.
2. Zang LY, Stone K, Pryor WA. Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free Radic Biol Med* 1990;8:275-9.
3. Kinnula VL. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax* 2005;60:693-700.
4. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 2006;533:222-39.
5. Barr J, Sharma CS, Sarkar S, Wise K, Dong L, Periyakaruppan A, et al. Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells. *Mol Cell Biochem* 2006. [Epub ahead of print]
6. Iho S, Tanaka Y, Takauji R, Kobayashi C, Muramatsu I, Iwasaki H, et al. Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF-kappaB. *J Leukoc Biol* 2003;74:942-51.
7. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnenmi I, et al. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2000;22:556-63.
8. Briede JJ, Godschalk RW, Emans MT, De Kok TM, van Aken E, van Maanen J, et al. In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism. *Free Radic Res* 2004;38:995-1002.
9. Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Amesjeiras A, Lopez-Real AM, Labandeira-Garcia JL. Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 2002;64:125-35.
10. Wei W, Kim Y, Boudreau N. Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults: NHANES III, 1988-1994. *Am J Public Health* 2001;91:258-64.
11. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1600-19.
12. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci* 1999;4:D339-45.
13. Nadeem A, Raj HG, Chhabra SK. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation* 2005;29:23-32.
14. Sato A, Hara T, Nakamura H, Kato N, Hoshino Y, Kondo N, et al. Thioredoxin-1 suppresses systemic inflammatory responses against cigarette smoking. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1891-6.
15. Lakari E. Expression of oxidant and antioxidant enzymes in human lung and interstitial lung diseases. Academic Dissertation to be presented with the assent of the Faculty of Medicine, University of Oulu, for public discussion in the Auditorium 1 of the University Hospital of Oulu, on April 19th, 2002. p.1-86.
16. Solak ZA, Kabaroğlu C, Cok G, Parildar Z, Bayindir U, Ozmen D, et al. Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. *Clin Exp Med* 2005;5:99-105.