

스테로이드의 투여가 말초혈액 단핵구에서 I κ B/NF- κ B 경로에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 내과학교실, 서울대학교병원 의학연구소, 서울대학교 의학연구원 폐연구소

윤호일, 이희석, 이창훈, 이춘택
김영환, 한성구, 심영수, 유철규

=Abstract=

Effect of Steroid Administration Ex Vivo on the I κ B/NF- κ B Pathway in Human Peripheral Blood Monocytes

Ho Il Yoon, M.D., Hee-Seok Lee, M.D., Chang-Hoon Lee, M.D.,
Choon-Taek Lee, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.

*Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine,
Seoul National University College of Medicine, Clinical Research Institute,
Seoul National University Hospital, Lung Institute, Medical Research Center, Seoul National University*

Background : Synthetic glucocorticoids are widely used in many chronic inflammatory diseases because of their excellent anti-inflammatory activity. Enhancing the transcription of I κ B and preventing activated NF- κ B from binding to κ B sites are thought to be the underlying mechanisms. But these data are largely derived from in vitro studies using cell lines. In this study, after administrating a steroid to volunteers, we evaluated the effect on the NF- κ B system.

Methods : Prednisolone(0.5mg/kg/d) was orally administered to 5 healthy volunteers for 7 days. Before and after the administration, we sampled their peripheral blood monocytes, and performed western blot analysis both with stimulation, using IL-1 β , LPS, TNF, and without stimulation(baseline). We also performed EMSA after stimulation with LPS.

Results : After ingestion of the steroid, baseline expressions of I κ B α were increased in two of the subjects, while suppressed degradations of I κ B α to stimulations were observed in all five. In addition, the binding capacity of NF- κ B after the administration was decreased.

Address for correspondence:

Chul-Gyu Yoo, M.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Seoul National University Hospital, 28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul, 110-744, Korea

Phone : 02-760-3760 Fax : 02-762-9662 E-mail : cgyoo@snu.ac.kr

Conclusion : Steroid plays such roles as enhancing the transcription of I κ B α , suppressing the DNA binding capacity of NF- κ B, and suppressing the degradation of I κ B α . (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2003, 54:542-550)

Keywords : Steroid, Glucocorticoid, NF- κ B, I κ B.

서 론

NF- κ B는 광범위하게 존재하는 전사인자로서 특히 면역기능을 담당하는 세포에서 중요성을 가진다. 처음에는 B 림프구에서 면역글로불린 κ -light chain 유전자 증강인자의 결합단백으로 분리되었으나¹, 지금은 포유류의 면역 그리고 염증과 관련된 반응에서 여러 유전자의 발현을 촉진하는 것이 알려져 있다. NF- κ B 전사인자군은 여러 가지 subunit로 구성된 homo- 또는 heterodimeric 이중합체들로서 이루어진다²⁻⁴. 이 군에 속하는 전사인자들은 모두 *v-rel* viral oncoprotein 과 그 cellular homologue 인 *c-rel* 에 구조적으로 연관되며 또한 DNA에의 결합과 이중합체형성에 필요한 domain을 가진다는 공통점을 갖는다⁵⁻⁸. 활성화된 NF- κ B는 p50과 p65로 불리는 두 가지 하위 구조 단백질로 구성된 이중합체가 가장 대표적으로 알려져 있다. 또한 그 활성화는 세포 내에서의 위치관계(subcellular localization)에 의하여 결정된다. 이 물질은 세포질 내에서 억제 인자인 I κ B 단백질과 결합한 비활성화형태(dormant complex)로 존재한다^{9,10}. 여러 가지 다양한 세포 외의 자극에 의하여 I κ B가 분리되면, 유리된 NF- κ B는 복합체의 형태로 세포핵 내로 이동하여 NF- κ B에 결합하는 특이 DNA sequence(κ B motif)에 결합함으로써 목표유전자(target gene)의 전사활성을 조절하게 된다. 이 같은 NF- κ B의 활성화에 따른 전사산물에는 각종 염증유발성 사이토카인, NOS나 COX-2 등의 염증성 효소, 세포부착분자들, IL-2 및 T 림프구의 수용체 등이 포함된다¹¹.

합성 스테로이드 제제는 많은 부작용에도 불구하고 그 뛰어난 염증억제 효과로 인해 만성 기관지천식, 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 낭창, 장기이식 후 거부반응 등의 치료의 근간을 이루고 있다¹²⁻¹⁵. 세포내에서 글루코코르티코이드는 글루코코르티코이드수용체(이하 GR)와 결합하여 수용체를 활성화시키고, 이러한 복합체는 핵 내로 들어가 glucocorticoid-response elements(이하 GRE)라 불리는 부위에 결합하여, 목표유전자의 전사를 증가시킨다. 그러나 글루코코르티코이드가 염증을 유발시키는 많은 사이토카인의 전사를 억제시키고, 이러한 사이토카인들의 유전자에는 GRE가 없다는 사실은 이러한 억제작용에 다른 기전이 존재할 가능성을 시사한다¹¹.

최근의 여러 연구결과 이와 같은 글루코코르티코이드의 염증억제 기전에, 면역 및 염증반응의 초기에 중요한 역할을 담당하는 NF- κ B가 관여한다는 사실이 알려지기 시작하였다¹⁵⁻²⁴. 실제로 글루코코르티코이드와 관련된 여러 실험적 결과가 대부분의 항염증작용이 NF- κ B의 억제를 통하여 이루어짐을 시사하며, 이는 크게 두 가지 기전을 가진다고 생각된다. 첫째는, GR과 NF- κ B 사이의 상호작용이다¹⁸⁻²¹. 이들은 서로 길항작용을 나타내며, 이러한 상호작용은 세포질과 핵 안 모두에서 발생한다²². 둘째는, 글루코코르티코이드가 I κ B의 전사를 증가시키는 것이다. I κ B 유전자의 promoter 영역에는 GRE가 존재하며 결과적으로 증가된 I κ B는 목표유전자의 κ B motif에 결합되어 있는 활성화된 NF- κ B와 결합하여, 이를 세포질로 내보내게 된다^{23,24}. 이 같은 사실은 실험적으로 T림프구

및 단핵구에서 관찰되었으나, 실제로 인체에 투여한 스테로이드 제제가 NF- κ B, I κ B 에 미치는 영향에 대한 연구결과는 없는 실정이다. 이에 저자들은 스테로이드의 투여가 NF- κ B 의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 연구를 수행하였다.

방 법

1. 대 상

5명의 건강한 지원자를 대상으로 하였으며, 0.5mg/kg/d의 prednisolone을 7일간 투여하였다.

2. 시 약

Recombinant human TNF- α , IL-1 β , LPS는 R&D System(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고 phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 후 여러 개로 나누어 사용할 때까지 -70℃에 보관하였다. Rabbit의 polyclonal anti-human I κ B α 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

3. 말초혈액 단핵구의 분리

헤파린을 첨가한 주사기에 말초혈액을 채취한 후 말초혈액 단핵구를 Ficoll-Hypaque(Sigma Diagnostics, St.Louis, U.S.A.)을 사용한 density sedimentation method를 이용하여 분리 후 2회 RPMI1640(GibcoBRL, Grand island, NY)으로 세척하였으며 5%PHS(pooled human serum)과 5% FCS(fetal calf serum)으로 재부유하였다. 0.1% trypan blue를 사용하여 세포 수를 확인한 후 5-10 \times 10⁶/ml로 세포 수를 맞추어 1ml PHS로 처리한 tissue culture dish에 5ml씩 넣어 37℃ 배양기에 1시간동안 배양하였다. 비부착세포를 씻어내고 2-5ml의

HBSS(GibcoBRL, Grand island, NY)를 넣어 4℃ 냉장고에 20-30분간 넣어둔 후 cell scraper로 부착세포를 분리하여 1% glutamine, 2% HEPES buffer, 5% 자가혈청을 함유한 RPMI1640 배양액으로 세포 수를 1 \times 10⁶으로 맞추었다. 이렇게 분리된 단핵구를 round bottom 96 well plate에 100 μ l (세포 수 1 \times 10⁵) 씩 넣어 37℃, 5% CO₂ 배양기에 밤새 배양하였다.

4. 단백질의 추출

총단백질을 추출하는 방법은 주로 Dejardin 등이 사용한 방법을 이용하였다²⁵. 먼저 “Western” Lysis Buffer를 0.1% NP-40(nonidet, Sigma 사), 5 mM EDTA, 50 mM Tris Hydrochloride(pH 7.5-8.0), 250mM NaCl, 50 mM Sodium Fluoride의 조성으로 만들어 준비하였다. 여기에 사용 직전에 protease inhibitor 인 1mM의 PMSF(phenylmethylsulfanylfuoride), 10 μ g/ml의 aprotinin, 10 μ g/ml의 leupeptin을 첨가하여 사용하였다. 배양된 세포들을 lysis buffer에 작용시킨 후 원심분리하고 supernatant만을 새 tube에 옮기고 단백질 정량을 시행하고 이후 실험에 사용할 때까지 -70℃ 냉장고에서 보관한다. 단백질 정량은 Bio-Rad Assay 방법으로 시행하였는데 Bovine Serum Albumin 표준용액을 사용하여 시행하였다.

5. 세포핵분획의 단백질 분리추출

Lysis Buffer(250 mM sucrose, 5 mM Sodium Azide, 2 mM EGTA의 용액에 사용 직전 protease inhibitor인 200 μ M PMSF, 1 μ M leupeptin, 1 μ M aprotinin 를 첨가한다.) 로 배양된 세포를 용해시킨 후 세포액을 1ml Pasteur pipette으로 회수하여 cell solution을 Dounce Homogenizer 의 pestle B로 20번 stroke 하여 세

포막을 분쇄하고 원심분리한다. Pellet에 lysis buffer를 넣어 용해시킨 후 원심분리를 시행하고 남은 pellet으로부터 nuclear fraction을 얻었다.

6. Western 분석법

세포내의 총단백을 Whole Lysis Buffer(0.1% Nonidet P40, 5 mM EDTA, 50mM Tris, pH 7.5-8.0, 250 mM NaCl, 50 mM NaF)로 추출한 후 bicinchoninic acid법으로 단백 농도를 측정하였다. 30 μ g의 단백을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane을 PBS로 희석한 5% skim-milk로 1시간 동안 비특이 결합을 차단하였다. 5% skim-milk에 1:1,000으로 희석한 rabbit polyclonal anti-I κ B α 항체를 membrane과 실온에서 밤새 반응시킨 후 PBS로 15 분씩 3번 세척하였다. Membrane을 5% skim-milk에 1:2,000으로 희석한 goat-anti-rabbit HRP-conjugated 항체로 1 시간 동안 반응시킨 후 PBS로 15분씩 3번 세척하였고 ECL kit를 이용해 발색시켰다.

7. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA)는 Duyao등의 방법을 이용하였으며²⁶ Band Shift kit (Pharmacia Biotech Inc., U.S.A.)를 사용하였다. 즉 NF κ B consensus oligonucleotide (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3')를 T4 polynucleotide kinase를 사용하여 [γ -³²P] ATP로 radiolabelling을 시행하고 purify하였다. 4% polyacrylamide gel을 만들고 pre-electrophoresis를 30 분간 시행하였다. 2 μ l oligonucleotide probe, 2 μ l nuclear protein extract, 500 mM NaCl, 5 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA, 5% glycerol, 1 μ g poly(dI-dC), 0.05% Nonidet P-40, 0.05 mg/ml

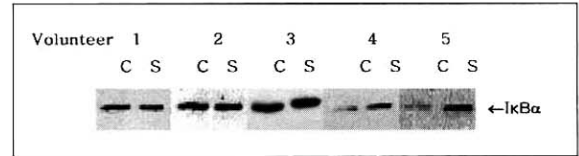


Fig. 1. Steroid ingestion increases baseline expression of I κ B in some volunteers. From peripheral blood monocytes before(C) and after(S) steroid ingestion, the level of I κ B in cellular extracts were detected by western blot analysis.

bovine serum albumin 을 총량 20 μ l가 되게 혼합한 다음 실온에서 20분간 반응시켰다. 이후 electrophoresis를 시행하고 gel을 건조시킨 후 -70℃에서 autoradiography를 시행하였다.

결 과

1. 스테로이드 투여가 기저상태의 I κ B α 의 발현에 미치는 영향.

스테로이드의 투여가 기저상태의 I κ B α 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 자원자 5명에서 스테로이드를 투여하기 전과 스테로이드를 7일간 투여한 후 말초혈액 단핵구에서 기저 상태의 I κ B α 의 발현을 관찰하였다. 세 명에서는 스테로이드 투여전과 후에 I κ B α 발현의 차이가 관찰되지 않았지만, 2명의 자원자에서는 스테로이드 투여 전과 비교해 스테로이드 투여 후에 기저상태의 I κ B α 발현이 증가되었다(Fig. 1). 따라서, 스테로이드 투여에 따른 I κ B α 발현은 사람에 따라 차이를 보임을 알 수 있었다.

2. 스테로이드 투여가 외부 자극에 의한 I κ B α 의 분해에 미치는 영향

스테로이드의 투여가 외부 자극에 의한 I κ B α 의

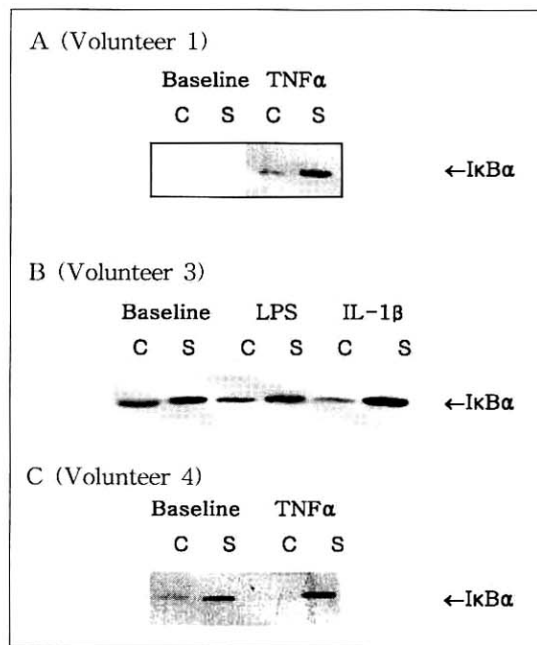


Fig. 2. Steroid ingestion inhibits degradation of $I\kappa B\alpha$
Peripheral blood monocytes before (C) and after(S) steroid ingestion were stimulated with $TNF\alpha$ (5ng/ml) for 30 minutes, LPS(1 μ g/ml) for 1 hour, or IL-1 β (5ng/ml) for 30 minutes. Then the level of $I\kappa B$ in cellular extracts were detected by western blood analysis.

분해에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 스테로이드 투여 전, 후에 분리한 말초혈액 단핵구를 $TNF\alpha$, LPS, IL-1 β 로 자극하고 $I\kappa B\alpha$ 의 발현을 평가하였다. 스테로이드 투여 전에 분리한 말초혈액 단핵구에서는 외부 자극에 의해 $I\kappa B\alpha$ 의 분해가 관찰되었는데, 스테로이드 투여 후에 기저 상태의 $I\kappa B\alpha$ 발현이 증가되지 않았던 자원자의 말초혈액 단핵구에서 외부 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해가 억제되었다(Fig. 2A, B). 스테로이드 투여로 기저 상태의 $I\kappa B\alpha$ 발현이 증가되었던 자원자의 말초혈액 단핵구에서도 외부 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해가 억제되었다(Fig. 2C). 이 결과는 스테로이드 투여

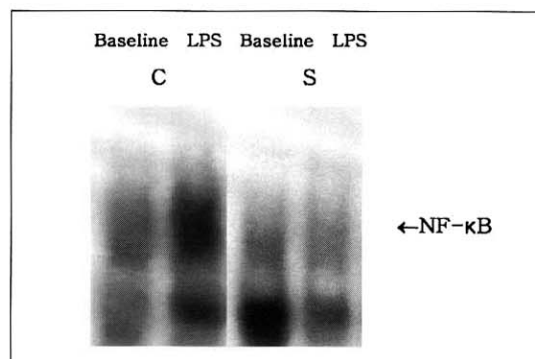


Fig. 3. Steroid ingestion reduces $NF\kappa B$ -DNA binding activity. Peripheral blood monocytes before(C) and after(S) steroid ingestion were stimulated with LPS(1 μ g/ml) for 1 hour. Then nuclear extracts were prepared and subjected to Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA) with κB site DNA probe as described in Materials and Methods.

후 기저 상태의 $I\kappa B\alpha$ 발현의 증가 유무와 관계없이, 스테로이드 투여는 생체 내에서 외부 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해를 억제함을 시사하는 소견이다.

3. 스테로이드 투여가 $NF-\kappa B$ 와 DNA 부착능에 미치는 영향

스테로이드의 투여가 기저 상태와 외부 자극에 의한 $NF-\kappa B$ 와 DNA 부착능에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 스테로이드 투여 전과 후에 얻은 말초혈액 단핵구를 각각 LPS로 자극하고 $NF-\kappa B$ 와 DNA 부착능을 electrophoretic mobility shift assay(EMSA)로 평가하였다. 기저 상태의 $NF-\kappa B$ 와 DNA 부착능은 스테로이드 투여 전의 말초혈액 단핵구에 비해 스테로이드 투여한 후의 말초혈액 단핵구에서 낮게 관찰되었다. 스테로이드 투여 전에 분리한 말초혈액 단핵구에서는 LPS 자극으로 $NF-\kappa B$ 와 DNA 부착능이 증가하였는데, 스테로이드

드를 투여한 후에 분리한 말초혈액 단핵구에서는 LPS 자극에 의한 NF- κ B와 DNA 부착능의 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

고 찰

글루코코르티코이드의 투여는 면역체계에 많은 변화를 유발한다. 우선 림프구의 재분포를 유도하여 혈중에 존재하는 림프구를 골수 등으로 이동시킬 뿐만 아니라²⁷, 림프구의 기능의 변화를 초래하여 림프구의 사이토카인 분비를 억제하고 자가 증식 능력을 떨어뜨린다^{27,28}. 현재까지의 여러 연구 결과는 글루코코르티코이드가 NF- κ B를 강력히 억제하며, 이것이 글루코코르티코이드의 염증억제작용의 주된 기전임을 시사한다¹⁵⁻²⁴. 즉 글루코코르티코이드에 의한 NF- κ B의 억제는, NF- κ B에 의해 전사가 촉진되는 여러 세포부착분자의 억제를 통해 림프구의 재분포를 유도하며, 각종 사이토카인의 분비를 억제해 통해 염증세포의 기능을 변화시킨다.

글루코코르티코이드가 NF- κ B를 억제하는 주된 기전의 하나로 규명된 GR과 NF- κ B 간의 상호억제작용은, 다른 세포 내 수용체와 전사인자, 혹은 서로 다른 전사인자 간에도 광범위하게 발생하여 여러 염증관련물질의 전사를 조절하는 것이 알려져 있다. 이것을 cross-coupling이라 부르며 이러한 다양한 결합에 의해 전사인자들과 해당 DNA 결합부위와의 상호작용이 항진되거나 억제된다. 예를 들면, NF- κ B /bZIP의 결합은 전사를 항진시키며, AP-1/GR이나 NF- κ B /GR의 결합은 전사를 억제시킨다²⁹⁻³¹.

본 연구에서도 스테로이드의 투여에 의해 NF- κ B의 DNA 부착능이 감소하는 것을 관찰하였으나 이 결과만으로는 이것이 NF- κ B의 핵으로의 이동이 제한되어 생긴 결과인지 아니면 핵 안에 있는 NF- κ B의 DNA 부착능이 억제된 결과인지를 판단하기는 어렵다.

NF- κ B 억제의 또 다른 기전인 I κ B 발현의 증가는 단핵구와 T림프구에서는 증명되었지만^{24,32}, 모든 세포에서 일어나는 현상은 아닌 것으로 생각된다³³. 글루코코르티코이드와 GR의 복합체가 GRE에 작용하여 I κ B의 전사를 촉진하고, 그 결과 증가된 I κ B 단백질이 세포질 내에서 활성화된 NF- κ B가 핵 안으로 이동하는 것을 방해하여 결과적으로 NF- κ B의 작용을 억제하는 것으로 이해된다.

본 연구에서는 자원자들 중 일부에서만 스테로이드 투여에 의한 I κ B α 의 기저발현 증가가 관찰되었다. 물론 I κ B α mRNA의 양을 비교하지 않았으므로 기저발현의 증가가 관찰되지 않은 자원자에서 I κ B α 전사의 항진여부를 결론짓기는 어렵다. 하지만 *in vitro*에서의 단일한 조건과는 달리 실제로 인체에 스테로이드를 투여했을 경우 사람마다 스테로이드에 의한 I κ B α 발현 증가의 정도가 다를 가능성도 염두에 두어야 한다.

글루코코르티코이드가 I κ B 분해를 억제하는 기전을 통하여 항염증작용을 일으킨다는 보고는 없었다. 실제로 Brostjan 등은 내피세포주를 LPS로 자극하였을 때, 스테로이드 전처치가 I κ B 분해를 억제하지 못함을 발표하였다³³. 하지만 본 연구에서는 5명의 자원자 모두에서 외부자극에 의한 I κ B 분해가 스테로이드 복용으로 억제됨을 확인하였다. 이는 *in vitro*에서와는 달리 실제로 인체에서 스테로이드의 항염증작용의 일부가 I κ B 분해의 억제를 통하여 이루어질 수도 있는 가능성을 강력히 시사한다.

본 연구의 제한점으로는 자원자의 수가 너무 적고 자원자간의 실험결과가 다소의 차이를 보인다는 점을 들 수 있으며 따라서 본 연구만으로는 새로운 기전에 대한 결론을 내리기는 어렵다. 향후 이 부분에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

그러나 이제까지 세포 수준에서 혹은 동물실험에서 규명되었던 스테로이드의 NF- κ B 억제와 그

기전들을 직접 인체에 스테로이드를 투여한 후 말초 단핵구를 분리하여 확인하였다는 점에서 본 연구의 의의를 찾을 수 있다. 스테로이드의 항염증 작용 기전에 대한 명확한 이해는, 스테로이드 내성의 극복과^{34,35} 좀 더 부작용이 적고 효과가 뛰어난 신약개발의 가능성을 제시한다는 점 외에도 염증 및 면역반응의 세포내 기전의 이해를 넓혀줄 것으로 기대한다.

요 약

배 경 :

스테로이드는 그 뛰어난 염증억제 효과로 여러 만성 염증성질환의 치료제로 널리 쓰이고 있다. 최근 스테로이드의 염증억제의 기전이 I κ B의 전사를 증가시키고, 활성화된 NF- κ B를 억제시키는 것으로 밝혀졌다. 그러나 대부분의 연구가 세포주에 스테로이드 처치를 한 후 이루어진 것이어서 본 연구에서는 인체에 직접 스테로이드를 투여한 후, 스테로이드가 NF- κ B에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

방 법 :

건강한 자원자 5명을 대상으로 prednisolone을 0.5mg/kg/d의 용량으로 7일간 투여하였고 투여 전과 후에 각각 말초혈액 단핵구를 추출하여 이를 자극하지 않은 군(baseline), IL-1 β , LPS, TNF로 자극한 군으로 나누어 I κ B α 에 대한 western blot을 시행하였다. 또한 투여 전후에 얻은 말초단핵구를 각각 LPS로 자극하고 EMSA를 시행하였다.

결 과 :

5명중 3명에서는 I κ B α 의 기저발현에 차이가 없었으나, 나머지 2명에서는 스테로이드 투여 후 I κ B α 의 기저발현이 증가하였다. 5명 모두에서 스테로이드 투여 후에 외부자극에 의한 I κ B α 의 분해가 억제되었으며, EMSA로 NF- κ B의 DNA 결합능이 감소하는 것을 확인하였다.

결 론 :

스테로이드의 항염증효과는 I κ B α 의 기저발현의 증가, NF- κ B의 DNA 결합능 감소, 그리고 자극에 의한 I κ B α 분해의 억제에 의한 것이다.

참 고 문 헌

1. Sen R., Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46:706-16
2. Miyamoto S, Verma IM. REL/NF- κ B /I κ B story. *Adv Ca Res*. 1995;66:255-92
3. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Antwerp DV, Miyamoto S. Rel/NF κ B/I κ B family : intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*. 1995;9:2723-35
4. Gilmore TD, Morin PJ. The I κ B proteins : members of a multifunctional family. *Trends Genet*. 1993;9:427-33
5. Ballard DW, Walker WH, Doerre S, Sista P, Molitor JA, Dixon EP, Pfeffer NJ, Hannink M, Greene WC. The v-rel oncogene encodes a κ B enhancer binding protein that inhibits NF- κ B function. *Cell* 1990;63:803-14
6. Bose HR. The Rel family : models for transcriptional regulation and oncogenic transformation. *Biochim Biophys Acta* 1992;1114:1-17
7. Walker WH, Stein B, Ganchi PA, Hoffman JA, Kaufman PA, Ballard DW, Hannink M, Greene WC. The v-rel oncogene : insights into the mechanism of transcriptional activation, repression, and transformation. *J Virol* 1992;66:5018-29
8. Wilhelmssen KC, Eggleton K, Temin HM. Nucleic acid sequences of the oncogene v-rel in reticuloendotheliosis virus strain T and its

- cellular homolog, the proto-oncogene c-rel. J Virol 1984;52:172-82
9. Baeuerle PA, Baltimore D. I κ B : A specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. Science. 1988;242:540-6
 10. Baeuerle PA, Baltimore D. A 65-kD subunit of active NF- κ B is required for inhibition of NF- κ B by I κ B. Genes Dev 1989;3:1689-98
 11. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B-A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med. 1997;336:1066-71
 12. Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. N Engl J Med. 1995;332:868-75
 13. Kirkham B, Corkill MM, Davison SC, Panayi GS. Response to glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis : in vitro cell mediated immune assay predicts *in vivo* response. J Rheumatol 1991;18:1130-3
 14. Langhoff EJ, Laderfoged J, Jacobsen BK. Recipient lymphocyte sensitivity to methyl prednisolone affacet cadaver kidney graft survival. Lancet. 1986 ;2:1296-7
 15. Scheinman R, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. Mol Cell Biol 1996;15:943-53
 16. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids : molecular mechanisms. Trends Pharmacol Sci 1993;14:436-41.
 17. Saatcioglu F, Claret FX, Karin M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. Semin Cancer Biol. 1994;5:347-59.
 18. Haddad E-B, Salmon M, Koto H, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF. Ozone induction of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) and nuclear factor- κ B in rat lung: inhibition by corticosteroids. FEBS Lett. 1996;379:265-8.
 19. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:752-6.
 20. Adcock IM, Shirasaki H, Gelder CM, Peters MJ, Brown CR, Barnes PJ. The effects of glucocorticoids on phorbol ester and cytokine stimulated transcription factor activation in human lung. Life Sci 1994;55:1147-53.
 21. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. Mol Cell Biol. 1995;15:943-53.
 22. Adcock IM, Brown CR, Barnes PJ. Tumour necrosis factor alpha causes retention of activated glucocorticoid receptor within the cytoplasm of A549 cells. Biochem Biophys Res Commun 1996;225:545-50.
 23. Adcock IM, Brown CR, Kwon OJ, Barnes PJ. Oxidative stress induces NF κ B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1994;199:1518-24.
 24. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. Science 1995; 270:283-6
 25. Dejardin E, Bonizzi G, Bellahcene A, Castro-

- novo V, Merville M, Bours V. Highly -expressed p100/p52(NF κ B2) sequesters other NF- κ B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene* 1995;11:1835-41
26. Duyao MP, Buckler AJ, Sonenshein GE. Interaction of an NF- κ B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4727-31
27. Cupps TR, Fauci AS. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.* 1982;65:133-55.
28. Smith KA. T-cell growth factor. *Immunol. Rev.* 1980;51:337-57.
29. Stein B, Baldwin, Jr. AS, Ballard DW, Greene WC, Angel P, and Herrlich P. Cross-coupling of the NF- κ B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.* 1993;12:3879-91.
30. Stein B, Cogswell PC, and Baldwin, Jr AS. Functional and physical associations between NF- κ B and C/EBP family members : a Rel domainbZIP interaction. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13:3964-74.
31. Perkins ND, Edwards NL, DuckettCS, Agranoff AB, Schmid RM, and Nabel GJ. A cooperative interaction between NF- κ B and Spl is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.*1993; 2:3551-8.
32. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C., Helmberg A., Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids:inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 1995;270:286-90
33. Brostjan C, Anrather J, Csizmadia V, et al. Glucocorticoid-mediated repression of NF- κ B activity in endothelial cells does not involve induction of I κ B α synthesis. *J Biol Chem* 1996;271:19612-6.
34. Barnes PJ, Adcock IM. Steroid resistance in asthma. *Q J Med* 1995;88:455-68.
35. Adcock IM, Lane SJ, Brown CR, Lee TH, Barnes PJ. Abnormal glucocorticoid receptor-activator protein 1 interaction in steroid-resistant asthma. *J Exp Med* 1995;182:1951-8.