일반담배(Cigarette)와 금연 보조 담배(금연초, 허브담배, 쑥 담배)의 기관지 상피세포에서 IL-6유리 효과비교

서울위생병원내과[1], 원광대학교 의과대학 내과학교실. 원광대학교 의과대학 산본병원[2]

김명찬[1], 정재일[1], 정종훈, 김학렬, 양세훈, 정은택, 김휘정[2]

The Comparison of the Effect of Cigarette and Stop Smoking-aiding Cigarette on Release of IL-6 from Bronchial Epithelial Cell

Myoung Chan Kim, M.D.[1], Jeil Jung, M.D. M.D.[1], Jong Hoon Jung, M.D., Hak Ryul Kim, M.D., Sei Hoon Yang, M.D., Eun Taik Jeong, M.D., and Hui Jung Kim, M.D[2].

Department of Internal Medicine, Seoul Adventist Hospital[1], and WonKwang University , School of Medicine, Sanbon Medical center, KunPo Korea[2]

Background and Aims : Cigarette smoking induces an inflammatory response in the airways, which may play a key role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Interleukin-6 (IL-6) is one of the cytokines that plays an important role in inducing bronchial inflammation. The aim of this study was to determine if the level of the pro-inflammatory cytokine, Interleukin-6 , is increased when the bronchial epithelial cells are exposed to a cigarette smoke extract (CSE) and an extract from stop smoking-aiding cigarettes, and examined the safety of these commercially available stop smoking-aiding cigarettes.

Method : Bronchial epithelial cells were exposed to CSE from cigarette and stop smoking-aiding cigarettes for 24 hours. ELISA was used to measure the IL-6 levels in the supernatant from each condition. The IL-6 mRNA levels were measured by Taqman Real time RT-PCR.

N-acetyl-L-cysteine(NAC) was added to each condition to determine if NAC can inhibit the release of IL-6 from the bronchial epithelial cells when they are exposed to CSE from cigarette and stop smoking-aiding cigarettes.

Result : When bronchial epithelial cells were exposed to a CSE from cigarettes and stop smoking- aiding cigarettes, each type of CSE stimulated IL-6 production from the bronchial epithelial cells. The IL-6 mRNA level in the Bronchial epithelial cells was also elevated and NAC was found to inhibit the release of IL-6 from bronchial epithelial cells when they were exposed to the CSE from cigarettes and stop smoking-aiding cigarettes.

Conclusion : Commercially available stop smoking-aiding cigarette can induce bronchial inflammation and can be harmful to smokers. Therefore, the safety of these cigarettes for smoking cessation should be evaluated.

(Tuberc Respir Dis 2005; 59: 530-535)

Key words : Cigarette, stop smoking-aiding cigarette, IL-6

서 론

담배연기에는 6000종이상의 다양한 화학물질이 있고 흡연하는 경우 이런 다양한 화학물의 영향으로 여러 종류의 폐질환을 유발한다.

본 연구는 2005년도 원광대학교 연구비 지원에 의하여 시행되었습니다.

Address for correspondence : **Hui Jung Kim, M.D.**
Division of Pulmonary Medicine, Department of internal medicine, Wonkwang University Sanbon Medical Center, 1126-1 Sanbon-dong ,Gunpo-city, Kyunggi-do
Phone : 031-390-2202 Fax : 031-390-2244
E-mail : hikim61@hotmail.com

Received : Oct. 5. 2005
Accepted : Oct. 31. 2005

흡연은 기도에서 염증반응을 유발하여 만성폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease)의 병태생리에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 현재까지 여러 보고에서 흡연이 기관지상피세포의 염증과 연관된 싸이토카인인 IL-6를 유리하게 한다고 알려져 있고, 정상 흡연자에서 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid)에서 IL-6가 증가되어 있다고 알려져 있다[1-3].

또한 만성폐쇄성 폐질환 환자의 기관지 폐포 세척액 검사상 IL-8, TNF-α와 더불어 IL-6도 증가되어 있고 이를 환자의 폐활량 값과 비교시 FEV_1값과 반비례 한다고 알려져 있어 흡연자에서 IL-6가 증가되어 있는 것이 만성폐쇄성 폐질환의 병태생리에 중요

한 역할을 한다고 알려져 있다[4].

우리나라는 과거보다는 흡연율이 감소되고 있는 추세지만, 다른 나라에 비해서 여전히 높은 흡연율을 보이고 있으며 이런 지속적인 높은 흡연 율로 인해 향후 흡연관련질환이 지속적으로 증가하리라 예상되어진다.

흡연으로 인한 폐질환 및 기타 여러 질병을 예방하기위해서는 무엇보다도 금연이 가장 중요한데 금연하기위한 방법은 스스로 본인의 의지로 금연하는 방법, 금연 교육에 참여하여 금연하는 방법, 흡연대용품을 이용해서 흡연의 오랜 습관을 점점 줄여 끊는 방법, 니코틴 대체요법으로 니코틴중독으로 인한 금단증상을 이겨내 금연에 성공하는 방법 등이 있다.

우리나라에서는 다른 나라에 비해 한약제 등을 이용해 만든 흡연대용품으로 금연을 시도하려는 흡연자들도 많아 여러 다양한 제품 들이 시중에 판매되고 있지만, 이들의 기관지, 폐에 대한 안정성에 관한 연구는 아직 부족한 실정이다. 특히 흡연자중 일부는 금연 보조담배를 사용하는 과정에서 이들을 상용하게 되어 금연 보조담배의 장기적 사용시 인체의 안정성 여부에 대한 연구는 중요하리라 사료된다.

이에 저자등은 국내에서 시판되는 3가지 종류의 금연 보조 담배(금연초, 허브담배, 쑥 담배)의 기관지 염증에 관한 효과를 알아보기 위해 이들 금연보조 담배와 일반담배의 추출물을 기관지 상피세포에 노출 시킨 후 이들 세포에서 IL-6의 유리 정도를 비교하여 연구하였다.

방 법

1. 세포 배양

기관지상피세포(human bronchial epithelial cell, HBEC)는 건강한 공여자에 의해 제공된 세포를 Kelsen 등의 방법으로[5] LHC-9 과 RPMI 1640 을 혼합한 배양액에서 배양하여 사용하였고, 또 기관지상피세포 세포주인 BEAS-2B(American Type Culture Collection ,CRL-9609; Rockville, MD). 세포를 함께 사용하였다.

2. 담배 연기 추출물(Cigarette smoke extract, CSE)

담배연기추출물(Cigarette smoke extract, 이하 CSE)은 Carp와Janoff[6]의 방법으로 만들었다. 100 mm길이의 filter가 없는 연구용 담배를(Research Grade Cigarette, University of Kentucky) Speed Pump (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)를 통해 연소시키면서 담배연기를 분당 50cc의 속도로 25 ml의 두 번 증류한 증류수 (ddH_2O)에 통과 시킨 뒤 0.22 µm pore filter (Lida Manufacturing Corp., Kenosha, WI)에 통과시켜 세균과 큰 입자를 제거하였다.

본 실험에서는 이 용액을 100% CSE 로 간주하여 LHC-D/RPMI 1640 medium 과 혼합하여 원하는 농도를 만들어 사용하였다. CSE는 매번 실험마다 새로 만들어 사용하였고 만든 후 30 분 이내에 사용하였다.

3. Material

본 연구에 사용된 금연보조담배는 금연초, 쑥 담배, 허브담배 3종을 선택해 비교하였다. 금연초는 두충잎을 원료로 하였고, 쑥 담배는 쑥을 원료로, 허브담배는 말린 인동초 꽃잎을 사용하였고 필터부위는 허브를 추가하여 만들었다.

항산화제로 사용된 NAC(N-Acetyl-L-Cysteine)는 Sigma에서 구입하였다.

4. ELISA

세포배양액의 IL-6 농도는 sandwich ELISA를 통해서 정량화 하였다.

200 ml well microtiter plate를 purified goat anti-hIL-6 antibody (R&D, Minneapolis, MN))로 coat한 뒤 4°C에서 24 시간동안 배양 후 3 번 PBS - 0.25% Tween-20 (washing solution)으로 세척 후 rIL-6 (Sigma, St. Louis)를 이용해 상온에서 90분 처리 후 다시 세척하고 ,rabbit anti-hIL-6 antibody (Calbiochem, La Jolla, CA)를 처리한다. 한시간 후에 human serum absorbed peroxidase conjugated goat anti-rabbit antibody (ICN Biomedical, Costa Mesa, CA)를 첨가

하고, 한시간 후에 세척한 뒤 orthophenyldiamine (Sigma, St. Louis)을 이용해 490 nm ELISA reader로 정량화 하였다.

5. Qantititive real-time PCR

기관지상피세포에서 일반담배 및 금연보조담배의 추출물에 의한 IL-6 mRNA 의 증가여부를 관찰하기 위해 24시간 동안 각각의 담배 추출물에 노출 후 기관지상피세포에서 Taq real time PCR로 IL-6 mRNA를 정량화 하였다.

사용한 IL-6 primer와 probe의 염기서열은 다음과 같다.

Human IL-6 primers
Name : IL-6---47F
Sequence : CTCCAGGAGCCCAGCTATGA
Name : IL-6--112R
Sequence : CCCAGGGAGAAGGCAACTG
TaqMan probe :
Name : IL-6--68T
Sequence : CTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGT

6. 실험 방법

24 well plate에 기관지상피세포를 1X 10^5/ml 의 농도로 LHC-D/RPMI로 배양 후 정해진 농도의 일반담배와 금연 보조담배의 추출물(CSE)을 배양액에 추가하여 24시간 배양 후 상층 액을 모아 각각의 조건에서 IL-6의 농도를 ELISA를 이용하여 정량화 하고, 처리된 세포를 이용해 qantititive real time PCR을 시행해 IL-6 m RNA를 정량화 하였다. 한편 NAC(N-Acetyl-L-Cysteine) 의 항산화효과에 의한 IL-6의 억제효과를 보기위해 10mM의 NAC를 함께 처리 후 IL-6의 농도를 보았다.

Acrolein과 Acetaldehyde는 알려진 담배의 주요한 유해성분으로 함께 처리하여 비교해 보았다.

7. 통계 처리

모든 값은 3번 이상의 실험결과로 평균±SEM으로 구했고, 양군간의 차이는 Student's t test를 이용했다. $P < 0.05$를 통계적으로 의미 있는 차이로 보았다.

결 과

1. HBEC에 관한 일반담배, 허브담배 및 쑥 담배의 IL-6유리 효과 비교

기관지 상피세포(Human bronchial epithelial cell, HBEC)에 연구용 일반담배 및 허브담배, 쑥 담배의

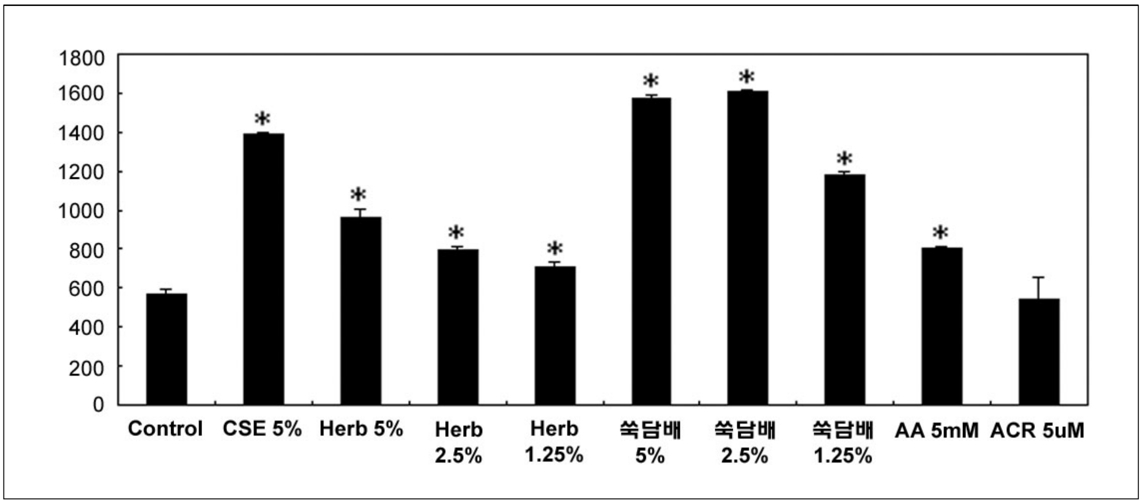

Figure 1. IL-6(pg/ml) Production by HBEC with varying concentrations of CSE and component of CSE. CSE 5% : 일반담배 5%, Herb : 허브담배, AA-acrolein, ACR-acetaldehyde. * p<0.05 compared with control

추출물을 배양액에 혼합하여 농도별로 24 시간동안 노출 후 배양액을 이용해 ELISA방법으로 IL-6농도를 구했다.

본 연구에서 사용한 일반담배, 허브담배(Herb) 및 쑥 담배 모두 대조군에 비해 의미 있는 IL-6의 증가를 보였고, 두 종류의 금연 보조담배에서도 농도에 따라 의미 있는 IL-6값의 차이를 보였다.

일반담배, 허브담배 및 쑥 담배에서 각기 5%농도의 담배추출물로 IL-6유리정도를 비교시 쑥 담배에서 의미 있게 가장 높았고 허브담배는 일반 담배보다 의미 있게 적은 정도의 IL-6유리를 보였다(Fig. 1.).

담배의 알려진 유해 물질인 Acroleine과 Acetaldehyde를 배양액에 함께 넣어 배양시 acroleine 5mM은 대조군에 비해 의미 있는 IL-6의 증가를 보였으나 acetaldehyde 5uM은 차이가 없었다.

2. HBEC에 대한 일반담배 및 금연 보조 담배의 IL-6 m RNA 발현

담배 및 금연 보조담배의 기관지 상피세포에서 IL-6 mRNA를 비교해 보았다. 대조군에 비해서 담배 및 금연보조담배에서 모두의미 있는 IL-6 m RNA유리를 보였고 특히 쑥 담배의 경우 많은 증가를 보여 다른 종류의 담배보다 IL-6 값의 의미 있는 증가를 보였던 ELISA결과와 부합되었다(Fig. 2.).

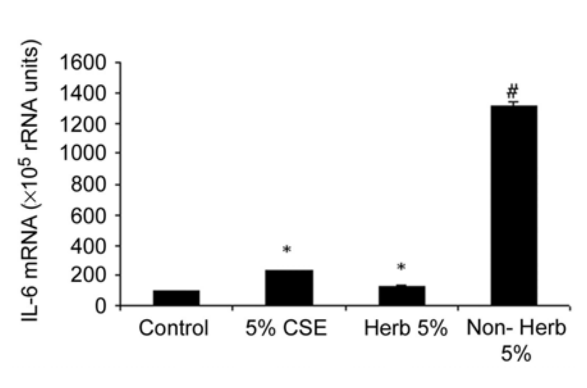

Figure 2. IL-6mRNA expression of HBEC with varying component of 5%CSE.
Herb : 허브담배, Non-Herb : 쑥담배. *p<0.05 compared with control.
#p<0.01 compared with control and other component of 5% CSE.

3. 담배 및 금연보조담배의 기관지 상피세포 (BEAS-2B) 에서 IL-6유리에 대한 NAC (N-Acetyl-L-Cysteine) 의 효과

기관지상피세포종인 BEAS-2B세포에서 담배 및 금연보조 담배 추출물 노출에 의한 IL-6유리효과를 다시 측정했고, NAC의 항 산화 효과가 이들의 IL-6 유리효과에 미치는 영향을 보기 위해 담배 추출물 노출시에 함께 배양액 넣어 효과를 비교해 보았다. 이들 담배들은 BEAS-2B 세포에서도 의미 있게 IL-6를 증가시켰고 항 산화 효과를 가진 NAC는 일반담배 및 허브담배에서는 이들의 증가를 의미 있게 억제 하였지만 쑥 담배에서는 이를 억제하지 못했다(*p>0.05)(Fig. 3.).

4. 금연초의 BEAS-2B 세포에 대한 IL-6유리효과 및 NAC의 IL-6유리에 대한 효과

우리나라에서 금연보조담배로 비교적 잘 알려진 금연초를 대조군 및 일반담배와 IL-6유리효과 및 NAC의 IL-6유리에 대한 억제효과를 비교하였다.

금연초에서도 의미 있는 IL-6증가를 보였고 항산화 효과를 가진 NAC는 5% 일반담배 및 5% 금연초

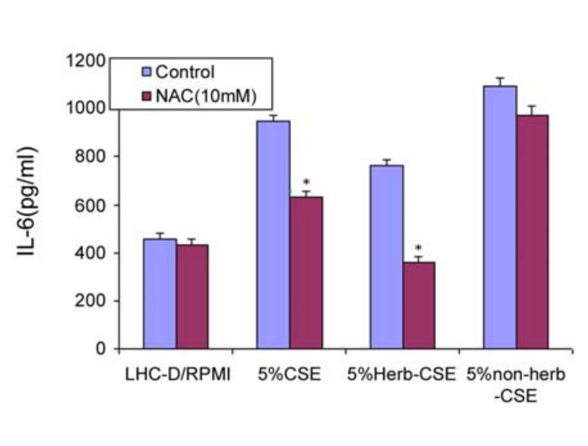

Figure 3. IL-6 release of BEAS-2B cells by expose of CSE and inhibitory effect of NAC on IL-6 release by CSE.
Control : each condition without adding NAC,
NAC : each condition with NAC: the release of IL-6 was significantly inhibited with NAC except 5% non-herb CSE. (*p<0.05).
non-herb CSE : 쑥담배.

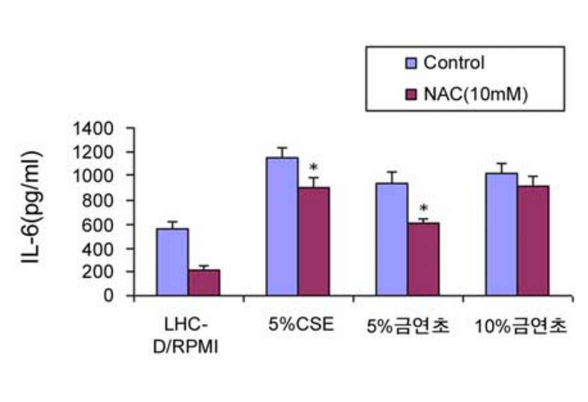

Figure 4. IL-6 release of BEAS-2B cells by expose of CSE and 5%/10% 금연초 and inhibitory effect of NAC on IL-6 release by CSE and 5%/10% 금연초.
Control : each condition without adding NAC,
NAC : each condition with NAC. The release of IL-6 on each condition was significantly inhibited with NAC except 10%금연초(* $p<0.05$)

에서는 이들의 증가를 의미 있게 억제 하였으나 10% 금연초에서는 억제하지 못했다(Fig. 4.).

고 찰

본 연구는 시중에 판매되고 있는 금연 보조담배 3종(금연초, 허브담배, 쑥담배)의 기관지 상피세포에 염증에 대한 효과를 알아보기 위해 일반담배와 이들 담배의 IL-6의 유리 효과를 비교 하였다.

일반 담배 및 금연 보조담배 3종은 대조군에 비해 의미 있게 기관지 상피세포에서 IL-6를 증가시켰고 특히 쑥담배에서 가장 많은 증가를 보였고 이는 m RNA 검사에서도 같은 경향을 보였다.

항산화 효과를 가진 NAC는 일반담배, 허브담배, 금연초 추출물에 함께 NAC 를 함께 투여한 경우 IL-6의 증가를 억제할 수 있었지만, 쑥담배에서는 의미 있는 억제효과를 관찰할 수 없었다.

IL-6는 기도의 기관지상피세포 및 대식세포등에서 생산되는 싸이토카인으로 흡연자에서 기관지폐포세척액 및 유도객담에서 IL-6가 증가되어 있음이 보고 되어져 있다.

흡연자의 기관지폐포세척액검사상 IL-8, TNF-α와 더불어 IL-6도 증가되어 있고, 이를 환자의 FEV_1예측치와 비교시 IL-8 및 IL-6값은 FEV_1예측치 값과 역비례 해 IL-6값이 높을수록 FEV_1예측치 값은 낮은 것으로 알려져 있다[1-3].

만성 폐쇄성 폐질환 환자의 급성 악화빈도는 평상시 객담 내 IL-6 및 IL-8값이 높을수록 증가된다고 알려져 있어 이들 싸이토카인이 급성악화의 빈도를 예측할 수 있는 지표로 이용 될 수 있음을 보고하였고, 이때 IL-8과는 달리 IL-6는 급성 악화 후에도 지속적으로 상승되는 것으로 알려져 있다[7,8].

본 연구에서는 흡연에 의해 기관지 상피세포에서 증가되는 여러 염증 지표 중에서 IL-6유리정도를 일반담배 와 금연 보조 담배를 이용해 비교하였다.

기관지 상피세포에서 일반담배 5%에서 의미 있는 IL-6증가를 보였고 허브담배, 쑥담배, 금연초등도 의미 있는 증가를 보였고 5%, 2.5%, 1.25%등 각각의 농도에 따른 차이를 보였다. 본 연구에서는 일반 담배와 각기 다른 성분으로 제조된 금연보조담배의 기관지 상피세포에서 IL-6유리 정도를 비교함에 있어, 시간대별 유리 정도를 비교하여 이들의 특성을 비교하기 보다는, 24시간 동안 담배 연기추출물에 의해 기관지 상피세포에서 유리된 IL-6의 총량을 ELISA방법으로 정량화하여 비교하였다.

IL-6 mRNA를 측정한 경우에도 같은 경향을 보여 일반담배 및 허브담배, 쑥담배에서 의미 있는 증가를 보였고 특히 쑥 담배에서 증가 되었다.

기관지 상피세포에 관한 이들 담배들의 IL-6유리 효과가 산화제와 연관되어 있는지 여부를 관찰하기 위해, 이전의 보고 등에서[9-11] 담배추출물에 의한 세포의 DNA 손상을 억제해 흡연으로 인한 폐 손상 으로부터 세포를 보호하는 것으로 알려져 있는 NAC를 항 산화제로 사용하여 함께 처리하였을 때, 쑥 담배에서는 의미 있는 억제를 보이지 않았지만 일반담배 및 허브담배, 5% 금연초 CSE에서는 의미 있게 억제되었다.

이들 3 종류의 금연보조 담배 중에서 쑥 담배가 IL-6에 대해 단백질 및 m RNA 검사에서 비교적 높은 증가를 보이고 상대적으로 NAC의 항 산화 효과에 억제되지 않았는데, 이런 차이를 보이는 이유로는 금연보조담배가 각각 원료가 다르고 이에 따라 연소시 발생되는 화학물질 및 산화제등의 농도의차이를 보이기 때문인 것으로 사료되며, 기관지 염증의 측면

에서 본다면 다른 금연보조제보다 많은 IL-6유리를 보이고, 반대로 항산화물질에 대해 억제가 적은 쑥담배가 인체에 더 유해하리라 사료된다.

요 약

연구 배경 :

우리나라에서는 다른 나라에 비해 약초 등을 이용해 만든 흡연대용품으로 금연을 시도하려는 흡연자들도 많고 이에 따라 여러 가지 다양한 제품 등이 판매되고 있는데 이들의 기관지, 폐에 대한 안정성에 관한 연구는 아직 부족한 상황이다. 특히 흡연자중 일부는 이런 금연 보조제를 사용하는 과정에서 이들을 상용하게 되어 시판되는 금연 보조담배의 장기적 사용시 인체의 안정성 여부에 대한 연구는 중요하리라 사료된다.

방 법 :

일반담배 및 금연 보조담배 3종의 담배연기추출물 (cigarette smoke extract, CSE)을 기관지 상피세포에 24시간 노출 후 배양액에서 IL-6를 측정하였고 일반담배 및 허브담배, 쑥담배 노출 후 세포에서 IL-6 m RNA를 측정하여 비교하였다. 항산화 효과를 가진 N - acetyl - L-cysteine(NAC)를 일반 담배 및 금연 보조담배 추출물에 함께 투여해 IL-6의 증가 억제여부를 보았다.

결 과 :

대조군에 비해 일반담배 및 금연보조담배3종에서 기관지 상피세포에 노출 시에 모두 의미 있는 IL-6증가를 관찰할 수 있었고, IL-6 m RNA도 같은 경향으로 증가 하였다. NAC를 함께 투여 시 일반 담배 및 허브담배 금연초에서는 IL-6의 증가를 의미 있게 억제하였지만 쑥담배에서는 억제하지 못하였다.

결 론 :

현재 우리나라에서 시판되고 있는 금연 보조담배 3종(허브담배, 쑥담배, 금연초)은 일반담배처럼 기관지 상피세포에 염증을 유발할 수 있어 장기적 사용시 인체의 안정성 여부에 대한 연구는 중요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate ofcigarette smokers. Eur Respir J 2003;21:589-93.
2. Patel IS, Roberts NJ, Lloyd-Owen SJ, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Airway epithelial inflammatory responses and clinical parameters in COPD. Eur Respir J 2003; 22:94-9.
3. Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H , Blanc PD. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. Eur Respir J 1996;9: 1989-94.
4. Barnes PJ, Stockley RA. COPD: current therapeutic interventions and future approaches. Eur Respir J 2005;25:1084-106.
5. Kelsen SG, Mardini IA, Zhou S, Benovic JL, Higgins NC. A technique to harvest viable tracheobronchial epithelial cells from living human donors. Am J Respir Cell Mol Biol 1992;7:66-72.
6. Carp H, Janoff A. Possible mechanisms of emphysema in smokers: in vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants. Am Rev Respir Dis 1978; 118:617-21.
7. Sauty A, Manuel J, Philippeaux M, Leuenberg P. Cytostatic activity of alveolar macrophages from smokers and non-smokers: role of interleukin-1ß, interleukin-6 and tumor necrosis factor-α. Am J Respir Cell Mol Biol 1994;11:631-7.
8. McCrea KA, Ensor JE, Nall K, Bleecker ER, Hasday JD. Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. Am J Respir Crit Care Med 1994;150:696-703.
9. Kim HJ, Liu XI, Wang H, Kohyama T, Kobayashi T, Rennard SI, et al. Glutathione prevents inhibition of fibroblast-mediated collagen gel contraction by cigarette smoke. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;283: L409-17.
10. Kim HJ, Liu XI, Kohyama T, Conner H, Kohyama T, Rennard SI, et al. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol 2004;31:483-90.
11. Carnevali S, Nakamura Y, Mio T, Liu XI, Takigawa K, Rennard SI, et al. Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction. Am J Physiol 1998;274:L591-8.