Journal of the Korean Society of
Tobacco Science Vol. 32, No. 1, 19~27(2010)
Printed in Republic of Korea

인간 유래 폐 세포주별 담배연기 분획의 염증 반응 민감도 비교

유지혜 · 손형옥 · 박철훈 · 이형석 · 장미 · 현학철 · 신한재*
KT&G 연구원
(2010년 5월 14일 접수 ; 2010년 5월 28일 수정 ; 2010년 6월 4일 승인)

Comparison of the Sensitivity of Human Bronchial Epithelial Cells to Cigarette Smoke-induced Inflammatory Responses

Ji-Hye Yoo, Hyung-Ok Sohn, Chul-Hoon Park, Hyeong-Seok Lee,
Mi Jang, Hak-Chul Hyun and Han-Jae Shin*
KT&G Research Institute, Daejeon 305-805, Korea
(Received May 14, 2010; Revised May 28, 2010; Accepted June 4, 2010)

ABSTRACT : The aim of this study is to compare the sensitivity of both two NCI-H292 and A549 cell types to acute inflammatory responses induced by cigarette smoke. For this, we treated two kinds of smoke fractions derived from 2R4F reference cigarettes: total particulate matter(TPM) collected onto a Cambridge filter pad and gas/vapor phase(GVP) prepared by bubbling through in buffer solution. When we measured cellular cytotoxicity by neutral red uptake assay after treatment for 24 hours, TPM and GVP induced cytotoxic effect in a dose-dependent manner in the range of 10-100 μg/mL and 60-300 μg/mL, respectively, in both cell types without any cellular difference. Additionally, when we examined acute inflammatory responses by analyzing cytokines secreted into culture media including tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-8(IL-8), and transforming growth factor-α(TGF-α) as well as matrix metalloproteinase-1(MMP-1), the treatment with smoke fractions increased those marker proteins in a dose-dependent manner in NCI-H292. Meanwhile, in A549 cells only MMP-1 was observed to be increased in a dose-dependent fashion. Collectively, our data indicate that NCI-H292 cell type is more sensitive to cigarette smoke-induced inflammatory response than A549 cells. This suggests that NCI-H292 could be useful as an in vitro evaluation tool to assess harmful effects of cigarette smoke.

Key words **: Total particulate matter, gas-vapor phase, inflammatory response, human cells**

최근 담배의 품질에 있어 생물학적 안전성에 관한 사항이 중요시되고 있다. 담배의 안전성 평가를 위해서는 담배연기 중 Cambridge glass fiber filter에 포집된 지름 0.1 μm이상의 입자인 고체상 분획 (total particulate matter: TPM)과 glass fiber filter에 포집되지 않고 통과한 물질로 정의된 가스상 분획 (gas/vapor phase)을 주로 사용하고 있다(Bombick *et al.*, 1998; Putnam *et al.*, 2002; Tewes *et al.*, 2003).

*연락저자 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 연구원
*Corresponding author : *KT&G Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea (phone: 82-42-866-5542; fax: 82-42-866-5544; e-mail: hjshin@ktng.com)*

담배연기는 흡연자에게 Chronic Obstructive Pulmonary Disease(COPD:만성폐쇄성폐질환)를 유발할 수 있는데, 이는 유해한 입자 성분이나 흡연에 의해 폐 기능이 점차 약화돼 결국 호흡곤란을 가져오는 병으로 알려져 있다(Pauwels *et al.*, 2001). 장기적인 흡연은 폐 조직으로의 neutrophils 침윤을 활성화시켜 세포 염증성 인자의 농도를 증가시키며, 단백질 분해효소 저해제의 불활성화를 촉진시켜, 결국 COPD의 병리학적 증상을 유발하는 것으로 보고된 바 있다(MacNee *et al.*, 1989; Rahman *et al.*, 1996a; Carp *et al.*, 1982). 담배연기는 기도 내 염증과 관련된 염증성 인자인 tumor necrosis factor-α(TNF-α)와 interleukin-8(IL-8)의 발현을 증가시킬 뿐만 아니라, necrosis factor-κβ (NF-κβ)와 activator protein-1(AP-1)과 같은 염증성 전사 인자들을 활성화시키게 된다(Anto *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 1996b; Heller mann *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2002).

담배 독성 평가에 널리 사용되고 있는 *in vitro* 방법은 미생물 또는 동물 세포를 이용하여 세포의 괴사, 돌연변이성 및 염색체 이상 유·무를 확인하는 시험 등으로 수행된다(Buckton and Evans, 1973; Ames *et al.*, 1975; Fenech and Morley, 1985; Balls and Clothier, 1992). 그러나 COPD의 주요 병리학적 특징인 점액의 과분비, 기도의 remodeling 그리고 폐 염증과 관련된 인자들을 측정할 수 있는 유효화된 *in vitro* 시험법은 없는 것으로 알려져 있다. H292 세포주와 인간 일차배양 상피세포를 이용한 최근의 연구에 의하면, 담배연기는 interleukin-8(IL-8), transforming growth factor-α(TGF-α), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 등의 발현을 증가시키는 것으로 보고하고 있다(Nordskog *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2005; Newland *et al.*, 2008). 그러므로 본 연구에서는 TNF-α, IL-8, TGF-α 그리고 MMP-1와 같은 4가지의 염증성 생체지표의 반응을 측정함으로써 폐 염증 평가를 위한 *in vitro* 방법의 가능성을 조사하고자 하였다. 인간 유래 폐 세포인 H292 세포와 A549 세포를 이용해 2R4F 표준담배 연기의 고체상 분획(TPM)과 가스상 분획(GVP)에 대한 폐 염증 관련 생체지표들을 측정하고 두 가지 세포에 대한 민감성을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

실험 재료

Nutrient Mixture RPMI medium(RPMI), fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin solution, phosphate-buffered saline(PBS) 등은 GIBCO(Grand Island, NY, USA)제품을 사용하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO), sodium dodecyl sulfate(SDS), neutral red, bovine serum albumin (BSA) 등은 Sigma-Aldrich(St.Louis, Missouri, USA) 제품을 사용하였다. 또한 ELISA 측정을 위한 assay diluent, Streptavidin-Horseradish peroxide, Tetramethylbenzidine(TMB) substrate reagent 등은 Beckton Dikinson(Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였으며, detection antibody 및 standard는 R&D system 제품을 사용하였다. 2R4F 표준담배는 Kentucky Tobacco Research & Development Center(University of Kentucky, Lexington, KY, USA)로 부터 구입하였다.

담배연기 입자상 및 가스상 분획의 제조

담배 주류연의 포집을 위해 표준담배(Kentucky reference cigarette 2R4F)를 ISO 3402(1999)에 따라 조화 시킨 후, Health Canada Official Method T-502(2004) 방법에 따라 담배를 연소시켰다. 담배 시제품 10 개피를 자동흡연장치(Borgwaldt RM20/CS, Germany)를 이용하여 ISO 표준흡연조건(puff volume: 35 mL, puff frequency: 60 sec, puff duration: 2 sec)하에서 연소시키고, 44 mm Cambridge filter pad를 이용하여 포집하였다. 적당량의 DMSO를 사용하여 Cambridge filter pad로부터 TPM을 추출하여, 10 mg/mL의 농도가 되도록 한 후 -70℃에 보관하면서 시험에 사용하였다. 담배연기로부터 가스상 분획(GVP)의 제조를 위해 100 mL gas washing bottle을 사용하였다. 흡연조건에 따라 10 개비를 자동흡연장치를 이용하여 연소시킨 후, Cambridge filter pad를 통과한 가스상 성분들을 10 mL의 ice-cold PBS(pH 7.4) 용액이 있는 gas washing bottle에 포집하였다. 제조한 가스상 분획(GVP)은 -70℃에 보관하면서 시험에 사용하였다.

세포주 및 세포배양

실험에 사용한 NCI-H292 세포주와 A549 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 분양받아 사용하였으며, 세포주기는 46 ± 2 및 30 ± 2 시간이었다. 두 세포는 10% FBS, penicillin 100 U/mL와 streptomycin 100 μg/mL이 포함된 RPMI 배양액을 사용하였다. 배양된 세포는 2~3일마다 0.25% trypsin - 0.03% EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다. 세포주의 자연발생적 돌연변이 생성을 최소화하기 위하여 구입 후부터 18번 이하 계대 배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 배양은 CO_2 배양기(Forma, USA)를 이용하여 포화 습도 하에서 37℃, 5% CO_2 상태로 배양하였다.

세포독성 시험

시험에 사용된 담배의 TPM 및 GVP에 대한 세포독성은 리소좀(lysosome)에 의한 neutral red 흡수 정도를 측정하는 neutral red cytotoxicity assay 방법을 사용하였다(Borenfreund and Puerner, 1985). 두 종류의 세포(1×10^5 cells/mL)를 24 well plate(n=3)에 이식해서 24시간동안 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 모든 실험에서 사용되는 대조군은 최고 농도의 시료가 첨가된 1%의 DMSO 처리군 및 PBS 처리군으로 하였다. 시험물질의 처리 후 2시간 및 24시간 동안 10% FBS, penicillin 100 U/mL와 streptomycin 100 μg/mL이 포함된 RPMI 배양액에서 배양하였으며, 세포배양이 끝나면 배양액을 제거한 후 200 μL의 neutral red 용액(50 μg/mL)을 처리하여 37℃에서 배양하였다. 3 시간 경과 후 neutral red 용액을 제거하고, 200 μL의 고정액(0.5% formaldehyde - 1% $CaCl_2$)으로 세포를 세척하였다. 유기용매 용액(50% ethanol - 1% acetic acid) 200 μL을 첨가해서 실온에서 15 분간 neutral red를 추출한 후 microplate reader (BIO-TEK, USA)를 사용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 생존율로 변환하였다.

염증지표 측정

2시간과 24시간동안 TPM과 GVP에 노출시킨 세포의 배양상등액을 이용하여 염증관련 생체지표의 발현량을 측정하고자 ELISA법을 적용하였다. 96 well plate에 coating buffer(0.1 M Sodium Carbonate, pH 9.5)와 각각의 anti-human TNF-α, TGF-α, MMP-1 및 IL-8 antibody를 1:200으로 희석하여 0.5 μg/mL의 농도로 100 μL씩 분주하고 4℃에서 overnight시켰다. 0.05% Tween-20을 포함한 PBS wash buffer로 세척하고, standard antibody를 serial dilution을 통해 준비하여 시료가 노출된 배양상등액 sample과 함께 plate에 분주하고 2시간 배양하였다. Detection antibody (biotinylated antibody)를 assay diluent로 희석하여 1시간동안 처리하고 Streptavidin-HRP를 0.1% 포함한 working detector solution에 30분 배양한 후, tetramethylbenzidine(TMB)과 hydrogen peroxide를 1:1로 희석한 substrate solution을 well 당 100 μL씩 첨가하여 색 변화를 관찰하였다. Stop solution(2N H_2SO_4)을 50 μL씩 넣은 후, 30분 이내에 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적인 방법

시료에 대한 세포독성의 수치는 EC_{50} 값으로 표기하였다. EC_{50} 값은 대조군에 비하여 50%의 생존율을 나타내는 시료의 농도이며, 용량-반응식을 이용하여 값을 구하였다. 세포독성 결과의 모든 EC_{50} 측정값은 μg/mL로 환산하여 표시하였다. SPSS (version 10.0) 통계프로그램을 이용하여 일원분산분석(ANOVA)을 실시하였고 사후분석으로 Duncan test를 통해서 $p<0.05$의 수준에서 각 시험군 간의 유의성을 검정하였다. ELISA 측정 결과를 얻기 위해 standard curve를 이용하여 배양상등액 내 염증생체지표의 단백질량을 산출하였다.

결과 및 고찰

TPM과 GVP에 대한 H292와 A549 세포의 세포독성 비교

TPM과 GVP가 두 종류의 인간 유래 폐 세포주의 세포독성에 미치는 영향을 살펴보고자 neural

red uptake(NRU) 방법을 사용하여 농도와 시간대별 세포독성을 측정, 비교하였다. NRU 세포독성 측정법은 TPM 뿐 아니라 GVP에 대해서도 적합성과 민감도를 갖는 방법으로 알려진 바 있다(Tewes *et al.*, 2003). Fig. 1은 0~100 μg/mL 농도의 2R4F 표준담배 고체상 분획(TPM)을 각 세포에 2시간과 24시간 처리시, H292와 A549 세포에서 나타난 세포독성을 측정한 결과이다. 대조군 대비 %생존율을 계산한 결과 Fig. 1과 같이, 2시간 시료 노출에 대한 세포생존율 변화는 없었으나, 24시간 처리한 경우, 두 종류의 세포 모두에서 농도의존적으로 세포독성이 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Putnam 등의 연구진이 발표한, 1R4F 표준담배의 TPM 농도 및 시간별 처리에 대한 세포독성 측정 시 24시간 처리에 대해 세포독성이 유의적으로 증가했던 결과와 일치한다(Putnam *et al.*, 2002).

마찬가지로 0~300 μg/mL 농도의 가스상 분획(GVP)을 세포에 노출시켜 세포독성을 측정하였을 때, Fig. 2의 결과와 같이, NCI-H292 세포에서는 2시간과 24시간 모두에서 농도의존적인 세포독성을 보였고, A549 세포의 경우 24시간 처리에 대해서만 농도의존적인 결과를 나타내었다. 따라서 두 종류의

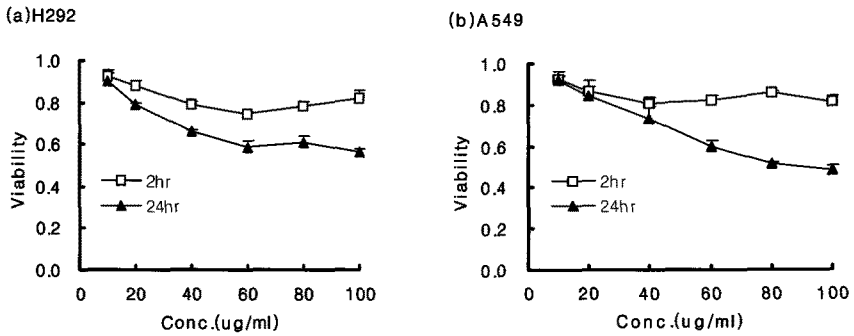

Fig. 1. A comparison of the cytotoxicity of TPM from 2R4F cigarette between (a)NCI-H292 and (b)A549 cells using neutral uptake assay. Cell viability was cal culated as a percentage of the control.

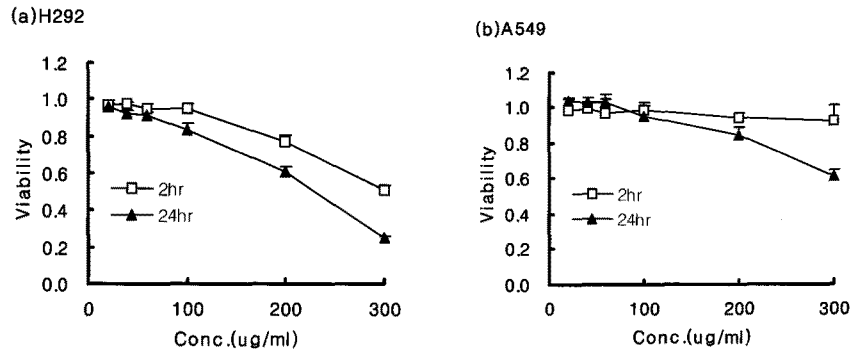

Fig. 2. A comparison of the cytotoxicity of GVP from 2R4F cigarette between (a)NCI-H292 and (b)A549 cells using neutral uptake assay. Cell viability was cal culated as a percentage of the control.

Table 1. EC_{50} values calculated from dose-response curve referring to different definition of exposure dose

Smoking fractions	Cell type	Cytotoxicity value on the calculation basis EC_{50} (μg TPM/mL)
TPM	H292	114.24
	A549	90.44
GVP	H292	255.71
	A549	391.29

인간 폐 세포주 모두 TPM과 GVP를 24시간 처리하였을 때, 농도의존적인 세포독성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

Table 1에 앞의 세포독성 결과에 따라 CalcuSyn 프로그램을 이용하여 얻은 EC_{50}(50%의 세포생존율을 보이는 농도)을 정리하였다. 24시간 노출시, NCI-H292와 A549 세포에서의 TPM에 대한 EC_{50} 값은 114.24 및 90.44 μg/TPM mL로 나타났고, GVP에 대한 EC_{50} 값은 255.71 및 391.29 μg/TPM mL로 나타나, 두 세포주 간의 세포독성 민감도에 있어 큰 차이가 없는 것으로 밝혀졌다.

세포주별 염증반응에 따른 민감도

담배연기로 인한 염증반응에 대하여 두 세포주의 민감도를 비교하기 위해, 세포독성 비교 실험과 같은 농도로 고체상, 가스상 분획에 2시간, 24시간 노출시킨 후 얻은 배양상등액에서 염증관련 생체지표의 단백질 발현 정도를 측정하였다. 본 연구에서는, 4가지 대표적인 염증관련 생체지표로서 알려진 TNF-α, IL-8, TGF-α, MMP-1을 선정하여 (Newland and Richter, 2008), ELISA 방법으로 담배연기 분획에 의한 생체지표 발현량 변화를 확인하였다. Fig. 3은 표준담배 연기의 TPM을 세포독성 확인시험과 같은 농도로 처리하여 얻은 배양상등액에서 4가지 생체지표의 단백질 발현 정도를 측정한 결과이다. H292 세포에서는 2시간 노출에 대해 발현량 변화를 보이지 않았으나, TNF-α, TGF-α, IL-8, MMP-1 모두 24시간 노출시 염증지표의 발현이 농도의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 그러나 A549 세포의 경우 24시간 노출시, 2시간 노출에 비해 발현량이 증가하기는 하지만 농도의존적 경향은 보이지 않는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 2R4F 표준담배의 TPM 0~200 μg/mL을 처리하였을 때, H292 세포에서 IL-8과 IL-6의 발현량이 농도의존적으로 증가한 Newland 등의 연구진 결과와 일치한다.

Table 2. A qualitative patterns of the observed responses at the protein level

	TPM		GVP	
	H292	A549	H292	A549
TNF-α	↑	NE	↑	NE
TGF-α	↑	NE	↑	NE
IL-8	↑	NE	↑	NE
MMP-1	↑	↑	NE	↑

↑: dose-dependently up-regulated by smoke fractions, when compared to the no treatment control., NE: no effect.

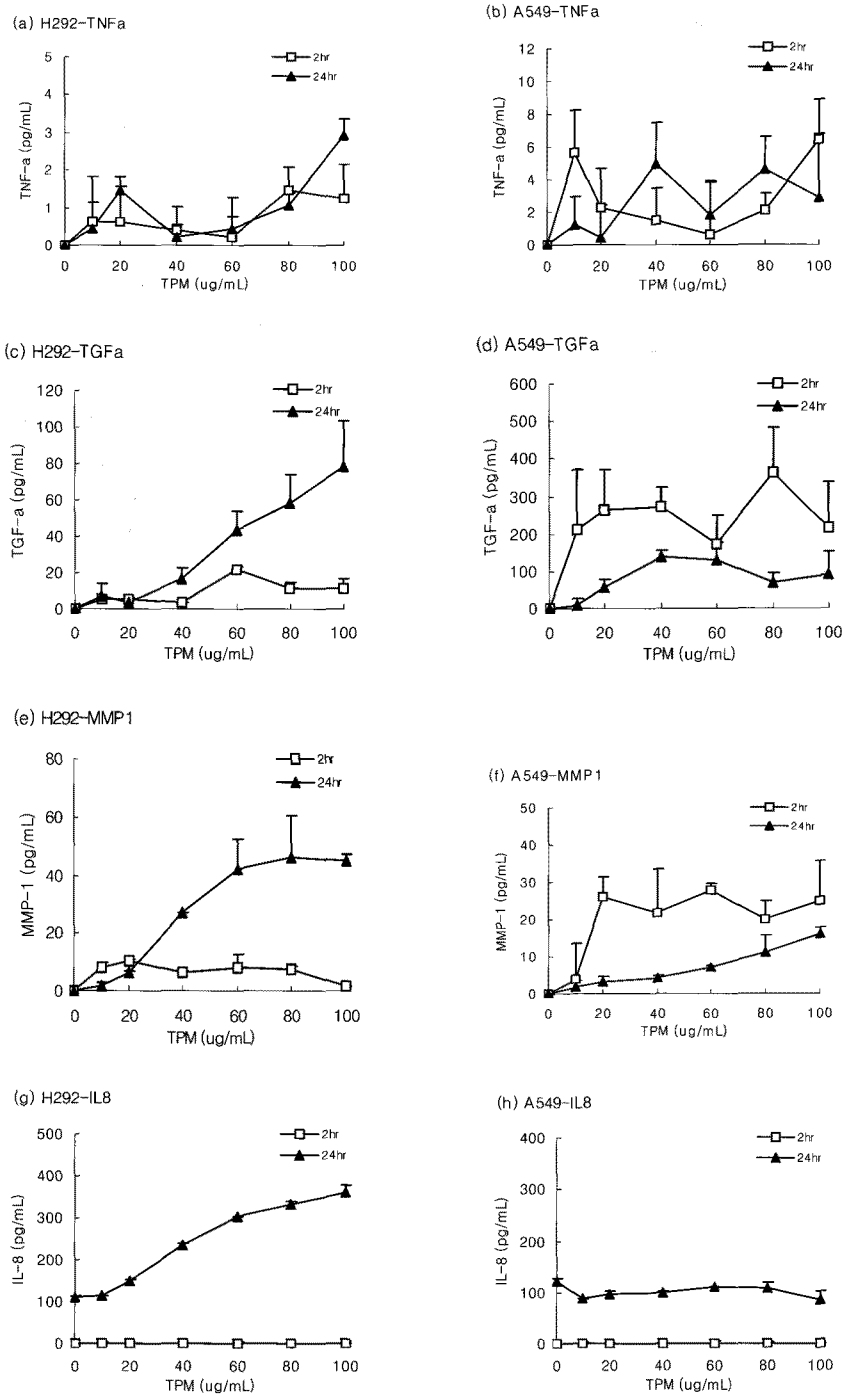

Fig. 3. Confirmation of protein expression patterns of (a),(b)TNF-α, (c),(d)TGF-α, (e),(f)MMP-1 and (g),(h)IL-8 on TPM-induced inflammatory responses from NCI-H292 and A549 cells cultured media for 2 & 24h by ELISA.

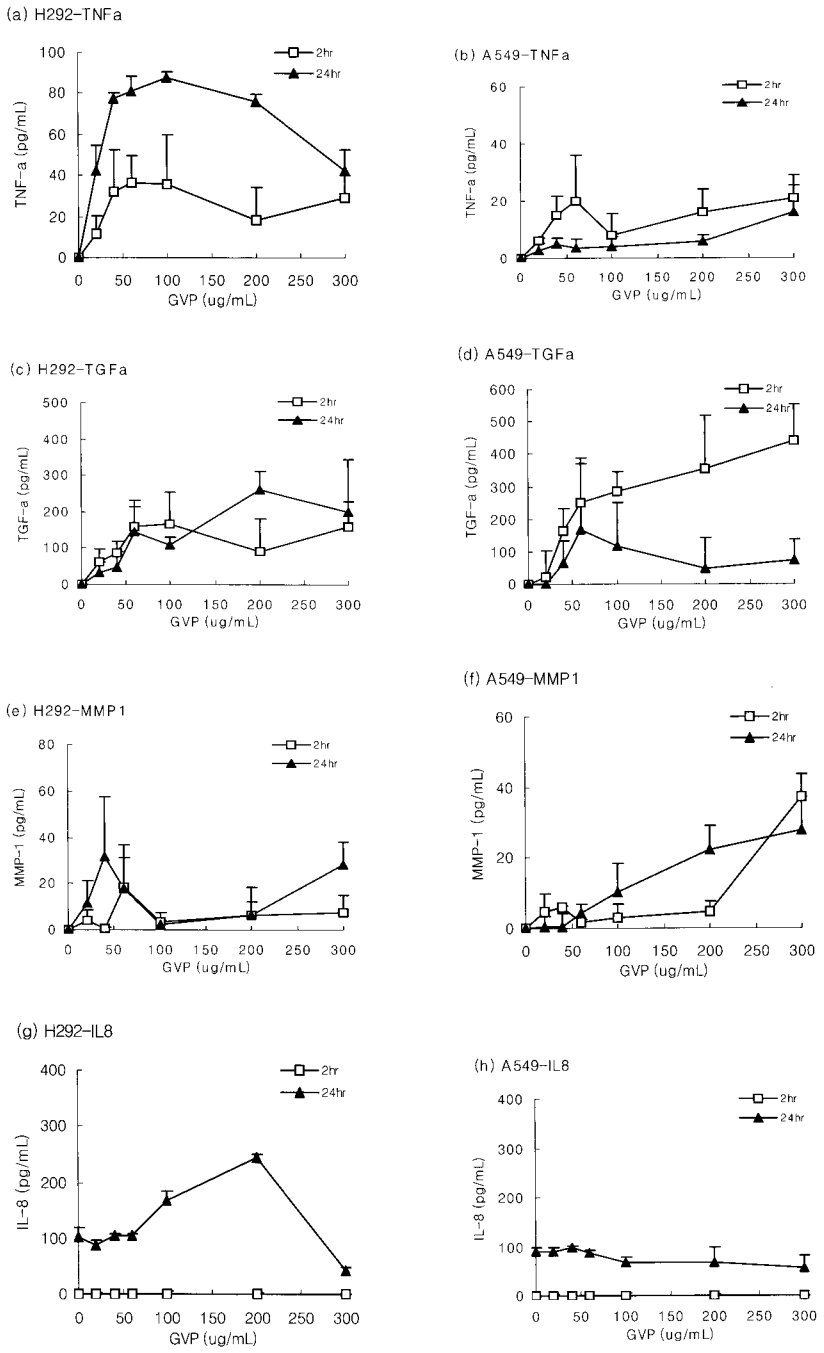

Fig. 4. Confirmation of protein expression patterns of (a),(b)TNF-α, (c),(d)TGF-α, (e),(f)MMP-1 and (g),(h)IL-8 on GVP-induced inflammatory responses from NCI-H292 and A549 cells cultured media for 2 & 24h by ELISA

또한 GVP 노출에 따른 염증반응에 대해서는 Fig. 4에서와 같이, 24시간 노출시 MMP-1을 제외한 TNF-α, TGF-α 및 IL-8 3가지 생체지표가 H292 세포에서 200 μg/TPMmL의 농도까지 농도의존적인 경향을 보임을 확인하였다. MMP-1의 경우 A549 세포에서만 증가되는 양상을 보였고, 다른 생체지표는 A549 세포에 농도에 따른 영향이 없음을 알 수 있었다.

Table 2는 본 연구의 세포주별 담배연기 분획에 의한 염증반응 민감도에 대하여 나타내고 있다. TPM과 GVP를 24시간 처리하였을 때 나타난 두 세포주 간의 염증 반응에 대한 민감도를 비교한 결과이다. 농도의존적으로 up-regulation된 경우 ↑로 나타내었고, 발현량에 영향이 없는 경우 NE(no effect)로 표시하였다. 결과적으로, TPM과 GVP 노출에 따른 염증 반응과 관련하여 H292 세포주에서의 민감도가 A549 세포에서보다 더 높음을 확인할 수 있었다.

결 론

본 연구는 인간 유래 폐 상피세포주인 NCI-H292와 A549 간의 담배연기에 대한 염증 반응의 민감도를 비교하여 폐 염증 평가로서의 이용가능성을 살펴보고자, 4가지 대표적인 생체지표의 발현 양상을 조사하였다. 두 세포주의 담배연기 분획 노출에 따른 세포독성 정도를 측정하기 위해, neutral red uptake assay법을 사용하였고, 24시간 처리시 두 세포주 모두에서 농도의존적으로 세포독성이 증가함을 확인하였다. 이 때, 두 세포주 간의 EC_{50}에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

하지만 담배연기 분획을 노출시켜 얻은 배양상등액에서 4가지 염증관련 생체지표의 발현량을 측정한 결과, A549 세포주보다 H292 세포주에서 더 높은 민감도를 보이는 것으로 확인되었다. 따라서 이번 연구 결과로 볼 때, H292 세포주를 이용한 염증지표 측정이 담배연기의 생물학적 독성 감소 연구나 COPD 질환 평가 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364.

Anto, R. J., Mukhopadhyay, A., Shishodia, S., Gairola, C. G., and Aggarwal, B. B. (2002) Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor kappa B through phosphorylation and degradation of IkappaB(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* 23: 1511-1518.

Balls, M. and Clothier, R. H. (1992) Cytotoxicity assays for intrinsic toxicity and irritancy. In: Watson, R.R. (Ed), *In Vitro methods of Toxicology*. CRC Press, Boca Raton, 37-52.

Bombick, D. W., Ayres, P. H., Putnam, K., Bombick, B. R. and Doolittle, D. J. (1998) Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 3. In vitro toxicity of whole smoke. *Food Chemical Toxicol.* 36: 191-197.

Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24: 119-124.

Buckton, K. E. and Evans, H. J. (1973) Method for the analysis of human chromosome abberration. World Health Oranization, Geneva, Switzerland pp.18.

Carp, H., Miller, F., Hoidal, J. R., and Janoff, A. (1982)Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2041-2045.

Fenech, M. and Morley, A. A. (1985) Measurement of micronucleic in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147: 29-36.

Health Canada (2004) Neutral Red Uptake Assay for Mainstream Tobacco Smoke. Official method T-502.

Hellermann, G.R., Nagy, S.B., Kong, X., Lockey, R.F., and Mohapatra, S.S. (2002) Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir. Res.* 3: 22-26.

ISO Standard 3402, fourth ed., (1999) Neutral Red Uptake Assay for Mainstream Tobacco Smoke. Official method T-502.

MacNee, W., Wiggs, B., Belzberg, A.S., and Hogg, J.C. (1989) The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *New Engl. J. Med.* 321: 924 - 928.

Newland, N., and Richter, A. (2008) Agents associated with lung inflammation induce similar responses in NCI-H292 lung epithelial cells. *Toxicology in vitro* 22: 1782-1788.

Nordskog, B. K., Blixt, A. D., Morgan, W. T., Fields, W. R., and Hellmann, G. M.,(2003) Matrix-degrading and pro-inflammatory changes in human vascular endothelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *Cardiovasc. Tox.* 3: 101 - 118.

Pauwels, R. A., Buist, A. S., Calverley, P. M., Jenkins, C. R, and Hurd, S. S. (2001) Globalstrategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructivepulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 163: 1256 - 1276.

Phillips, J., Kluss, B., Richter, A., and Massey, E. D. (2005) Exposure of bronchial epithelial cells to whole cigarette smoke; Assessment of cellular response. *Altern. Lab. Anim.* 33: 239-249.

Putnam, K. P., Bombick, D. W. and Doolittle D. J. (2002) Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. in Vitro* 16: 599-607.

Rahman, I., Morrison, D., Donaldson, K., MacNee, W. (1996a) Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 154: 1055 - 1060.

Rahman, I., Smith, C .A., Lawson, M. F., Harrison, D. J., and MacNee, W. (1996b) Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells. *FEBS Lett.* 396: 21 - 25.

Richter, A., O'Donnell, R. A., Powell, R. M., Sanders, M. W., Holgate, S. T., Djukanovic, R., and Davies, D. E. (2002) Autocrine ligands for the epidermal growth factor receptor mediate interleukin-8 release from bronchial epithelial cells in response to cigarette smoke. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 27: 85 - 90.

Tewes, F. J., Meisgen, T. J., Veltel, D. J., Roemer, E. and Patskan, G. (2003) Toxicological evaluation of electrically heated cigarette. Part 3: genotoxicity and cytotoxicity of mainstream smoke. *J. Appl. Toxicol.* 23: 341-348.