

황사의 PM₁₀이 WI-26 VA4 Cells에서 Reactive Oxygen Species, NF- κ B, TGF- β , Fibronectin의 발현에 미치는 영향

가천의과학대학교 ¹의학전문대학원, ²길병원 호흡기내과

박경선¹, 김유진², 윤진영², 경선영², 안창혁², 이상표², 박정웅², 정성환²

Particulate Matter 10 from Asian Dust Storms Induces the Expression of Reactive Oxygen Species, NF- κ B, TGF- β and Fibronectin in WI-26 VA4 Epithelial Cells

Kyeong Seon Park¹, Yu Jin Kim, M.D.², Jin Young Yoon², Sun Young Kyung, M.D.², Chang Hyeok An, M.D.², Sang Pyo Lee, M.D.², Jeong Woong Park, M.D.², Sung Hwan Jeong, M.D., Ph.D.²

¹Gachon University of Medicine and Science, ²Division of Pulmonology, Department of Internal Medicine, Gachon University Gil Medical Center, Incheon, Korea

Background: Particulate matter may be toxic to human tissue. Ambient air particulate matter $\leq 10 \mu\text{m}$ in aerodynamic size (PM₁₀), which changes under different environmental conditions, is a complex mixture of organic and inorganic compounds. The Asian dust event caused by meteorological phenomena can also spread unique particulate matter in affected areas. We evaluated production of ROS, TGF- β , fibronectin, and NF κ B by exposing normal epithelial cells to Asian dust particulate matter.

Methods: Bronchial epithelial cells were exposed to 0, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ of a suspension of PM₁₀ for 24 h. ROS were detected by measurement of DCF release from DCF-DA by FACScan. TGF- β , fibronectin, and NF κ B were detected by western blotting.

Results: PM₁₀ exposure increased the expression of TGF- β , fibronectin, and NF κ B. ROS production and TGF- β levels were significantly higher with 50 or 100 $\mu\text{g/ml}$ PM₁₀. Fibronectin and NF κ B production were significantly higher after 100 $\mu\text{g/ml}$ of PM₁₀.

Conclusion: PM₁₀ from Asian dust particles might have fibrotic potential in bronchial epithelial cells via ROS induction after PM₁₀ exposure. (*Tuberc Respir Dis* 2008;65:504-511)

Key Words: Particulate matter, Asian dust, Reactive oxygen species, Pulmonary fibrosis

서 론

미세먼지는 다양한 크기, 구성 그리고 발생원을 가지고 있는 대기오염 물질로, 그 구성은 대부분 화석연료의 연소 과정에서 배출되는 것으로서 공단이나 차량 등 인위적인 환경 오염에서 비롯된다. 그러나 최근 국내에서는 자연 환경 자체에 의한 대기 오염도 상당히 심각한데 그 중 하

나가 황사현상이다¹.

2001년 이후 우리나라에서 관측된 황사(38회)의 발원 지별 분포를 보면, 내몽골고원이 주 발원지이며, 크기가 큰 입자들은 발원지나 주변에 머물고 국내에 유입되는 황사의 크기는 대개 10 μm 이하의 미세먼지(particulate matter 10, PM₁₀)로 황사현상이 관찰되는 경우는 PM₁₀ 수치도 더불어 상승하고, 우리나라에서 대기중 황사에 의한 미세먼지 농도가 400 $\mu\text{g/m}^3$ 이상일 경우 황사경보가 발령된다.

이러한 미세먼지는 호흡기계에 심각한 손상을 일으킬 수 있다².

PM₁₀이 호흡기 질환자의 증상 악화 및 사망률을 유발하는 기전에 대해서 지금까지 여러 연구가 이루어졌으며, 초파리, salmonella, yeast, 그리고 백혈구 등을 대상으로

Address for correspondence: Sung Hwan Jeong, M.D., Ph.D.
Division of Pulmonology, Department of Internal Medicine,
Gachon University Gil Medical Center, 1198, Guwol-dong,
Namdong-gu, Incheon 405-760, Korea
Phone: 82-32-460-3200, Fax: 82-32-469-4320
E-mail: jsw@gilhospital.com

Received: Sep. 12, 2008

Accepted: Nov. 17, 2008

한 연구에서는 PM₁₀이 직접적으로 DNA에 돌연변이를 일으킬 수 있다는 결과도 나왔다^{3,4}.

이런 PM₁₀의 작용에는 ROS (Reactive oxygen species)가 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이전의 보고에 의하면 ROS가 TGF- β 를 유도한다는 결과가 확인된 바 있으며^{5,6}, 섬유화에도 관여할 수 있는 것으로 알려져 있다⁷. 또한 PM₁₀이 실험실적으로 폐 상피세포와 대식세포에 작용하여 염증 반응을 유발한다는 것이 여러 연구에서 증명되었다. 특히, 염증성 cytokine인 IL-1, IL-8, GM-CSF 생성이 많이 증가하였는데, 이들은 폐 내 국소적인 염증반응을 일으킬 수 있으며, 전신순환을 하게 될 경우 전신 염증 반응도 유발할 수 있다고 보고되고 있다⁸. 한편 염증을 일으키는 Cytokine 유전자들은 전사인자에 의해 조절되는데, 특히 NF- κ B의 활성화 과정 등에, PM₁₀에 의해 NF- κ B가 활성화되면서 DNA에 결합하여 염증성 cytokine 등이 증가한다는 연구 결과가 보고되었다⁹.

국내 환경의 특성상 황사현상을 고려하여 PM₁₀이 호흡기에 끼치는 위해에 대한 연구는 반드시 필요하다. 본 연구에서는 황사에 포함된 PM₁₀이 폐상피세포에 작용하여 ROS 생성을 증가시키는지, 또한 ROS가 TGF- β 를 유도할 수 있으며 증가된 TGF- β 에 의해 Extracellular matrix protein인 fibronectin이 증가하는지를 관찰하였고, 이 과정에서 NF- κ B의 증가 유무를 관찰하고, 또한 항산화제에 의한 ROS 및 NF- κ B, TGF- β , fibronectin의 억제 유무를 확인하여, 황사에 포함된 PM₁₀이 폐섬유화 과정에 영향을 미칠 수 있는지를 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. PM₁₀ 준비 및 성상

2006년 4월 봄철 황사 발생 시기에 대기에서 직접 시료 포집을 하였다. 공기 포집기(HV500F, Sibata, Japan)를 이용하여 인천지역(인천시 남동구 구월동 가천의대 길병원 응급센터 옥상)에서 분당 500 liter로 하루 6시간씩 대기 분진을 pore size 0.25 μ m filter (Prefilter AP, 124 mm, Millipore, Bedford, MA, USA)를 통해 포집하였다. 포집한 filter를 조각내어 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 30분간 혼합한 후 필터는 건져내고 나머지를 10 μ m pore filter (MitemexTM membrane filters, Millipore, Bedford, MA, USA)로 여과하였다. 약 1분간 초음파분쇄기로 파쇄(sonication)하고, 121°C에서 15분간 멸균한 후 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

실험에 사용된 PM₁₀입자의 크기는 평균 6.2 μ m였다. 2006년 봄철 인천의 대기 성분에 관한 연구에서 PM₁₀의 성분으로 NaCl, CaCO₃ 등의 입자들, 그리고 토양기원의 AlSi, SiO₂와 같은 입자들이 주로 발견되었으며, 황사시에는 AlSi, SiO₂와 같은 토양기원의 입자들이 확연히 증가함을 확인할 수 있었으며¹⁰, 국내에 유입되는 황사의 주 성분은 이온성분이 절반 이상을 차지하며, 그 중 가장 많이 함유되어 있는 성분은 SiO₂로서 전체 중 48%를 차지하고 있었고, 이 밖에 많은 중금속 물질들과 산성강하물질인 음이온성분 NO₃⁻와 SO₄²⁻과 중화시키는 물질인 양이온 성분 NH₄⁺ 등이 포함되어 있었다. 미세먼지 내 중금속 성분 중 가장 많은 분포를 보인 것은 토양에서 기원하는 Fe, Al, Ca, Mg였으며, 해양에서 나오는 Na 역시 높은 농도를 보였다. 그리고 인위적인 오염원에 기인하는 Zn, Pb, Cu, Mn이 높게 나타났으며, 불규칙성은 있으나 해가 갈수록 조금씩 증가하는 경향을 나타냈다. 황사기에는 특히 해양 기원인 Na⁺와 Cl⁻가 평상시의 2배 이상 증가하고 Mg²⁺와 Ca²⁺ 역시 거의 유사하게 증가하였으며, 주로 토양성분인 Mg, Al, Ca, Fe가 각각 6.16배, 8.06배, 7.64배 그리고 3.84배로 크게 증가하여, 이전의 분석결과와 비슷하였다¹¹.

2. 세포배양 및 N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) 처리

정상 폐상피세포인 WI-26, VA4 세포(KCLB, Seoul, Korea)를 10% 우태아 혈청이 포함된 5.6 mM 포도당 함유 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지에서 계대배양하였다. Hemocytometer를 이용하여 세포 수를 세어 확인한 후, 6-well plate에 세포 수가 2.5 \times 10⁵ cells/well이 되도록 계산하여 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세포를 관찰하여 세포가 90~100% 배양되면 0.5% 우태아 혈청을 포함한 DMEM으로 교체하여 24시간 배양함으로써 세포 성장을 정지시키고 성장주기를 동일화하였다(starvation). 그 이후 PM₁₀을 각각 0, 50, 100 μ g/ml의 농도로 가해준 후, PBS buffer에 혼합하여 24시간 동안 CO₂ incubator에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. PM₁₀을 가하지 않은 세포에는 PBS buffer만 가하였다. NAC (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)의 영향을 알아보기는 실험군에서는 배양과 starvation을 거친 세포에 NAC를 5 μ M씩 첨가한 후 1시간 후에 PM₁₀을 가하였다. NAC를 처리하지 않은 세포군과 동일한 방법으로 ROS 측정 및 TGF- β , fibronectin, NF- κ B 측정을 위한 western blot을 시행하였다.

3. Western blot analysis

세포 배양이 완료된 후 PBS buffer를 가해 세척한 후 lysis buffer (Pro-PREP protein extraction solution; Intron Biotechnology, INC., Seoul, Korea) 100 μ l/well을 가하여 세포를 수확한 후 20°C에서 30분간 배양하고, 원심분리하여 상층액을 따내었다.

NF- κ B는 PM₁₀의 농도를 각각 0, 50, 100 μ g/ml 가하여 동일한 방식으로 실험한 표본에서 상층의 배지를 채취하여 원심분리한 후 상층액을 따내어 표본을 준비하였다.

TGF- β 와 fibronectin을 측정할 표본은 Bradford assay로 단백질을 정량한 후, loading buffer와 섞어 30 μ g 분량이 되게 하여 8% Acrylamide gel에 각각 loading하였다. NF- κ B를 측정하기 위하여 배지의 상층액 35 μ L, 6X loading buffer 7 μ L을 섞어 loading하였다. Marker는 3 μ L를 loading하였다.

1시간 30분 동안 100 V로 전기영동하여 단백질을 분리한 후 완충액을 이용하여 PVDF membrane (Roche, Indianapolis, IN, USA)에 전이하였다(1시간, 100V). Membrane을 blocking 용액 PBST (Tween 20, 1%)에 녹인 5% non fat milk)에 넣고 1시간 동안 반응시켰다. Primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 PBST (0.1%)에 1 : 700으로 희석시킨 후 membrane을 담가 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. Secondary antibody (Santa Cruz biotechnology)를 PBST (0.1%)에 1 : 20,000으로 희석하여 1시간 동안 incubation 하였다. PBST (0.1%)로 세척한 후 enhanced chemiluminescence detection reagents (WEST-SOL plus; Intron Biotechnology, INC., Seoul, Korea)에 반응시킨 후 각 band의 단백질량을 densitometry로 정량하였다.

4. 세포 내의 Reactive oxygen species 측정

PM₁₀을 가하고 나서 24시간 지난 후에 Cell-permeable fluorogenic probe인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) (Molecular Probes INC., Eugene, OR, USA)를 PM₁₀이 처리된 각 세포 well에 5 μ M씩 가해준 후 세포 배양기에서 20분간 배양하였다. PBS buffer로 배지에 남아 있는 DCF-DA를 2회 세척하여 제거한 후 세포 내의 산화과정을 통해 생성된 DCF를 FACScan flow cytometer (FACSflow; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정된 세포 수는 각 표본당 20,000개로 하였다.

또한 Confocal microscopy (IX81; Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 세포 내의 ROS의 발현 여부를 사진으로 찍었다.

5. 분석 방법

모든 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. PM₁₀의 농도에 따른 ROS 발현량의 차이는 실험군의 수가 적어서 비모수적인 검정을 하였다. Kruskalwallis test를 거쳐 $p < 0.05$ 인 군을 다시 비모수적 방법인 Mann-Whitney Test를 적용해 분석하였으며, NAC를 처리한 이후 달라지는 정도는 Wilcoxon Signed Ranks Test를 적용하여 분석하였다. $p < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판단하였다. 사용된 통계 프로그램은 SPSS version 13.0이었다.

결 과

1. 황사의 성상

2006년 봄철 인천지역의 대기 성분에 관한 연구에서 PM₁₀의 성분으로 NaCl, CaCO₃ 등의 입자들, 그리고 토양기원의 AlSi, SiO₂와 같은 입자들이 주로 발견되었으며, 황사 시에는 AlSi, SiO₂와 같은 토양기원의 입자들이 확연히 증가함을 확인할 수 있었으며¹⁰, 국내에 유입되는 황사의 주 성분은 이온성분이 절반 이상을 차지하며, 그 중 가장 많이 함유되어 있는 성분은 SiO₂로서 전체 중 48%를 차지하고 있었고, 이 밖에 많은 중금속 물질들과 산성강하물질인 음이온성분 NO₃⁻와 SO₄²⁻과 중화시키는 물질인 양이온성분 NH₄⁺ 등이 포함되어 있었다. 미세먼지 내 중금속 성분 중 가장 많은 분포를 보인 것은 토양에서 기원하는 Fe, Al, Ca, Mg였으며, Na 역시 높은 농도를 보였다. 그리고 인위적인 오염원에 기인하는 Zn, Pb, Cu, Mn이 높게 나타났으며 불규칙성은 있으나 최근 조금씩 증가하는 경향을 나타냈다. 황사기에는 특히 해양기원인 Na⁺와 Cl⁻가 정상시의 2배 이상 증가하고 Mg²⁺와 Ca²⁺ 역시 거의 유사하게 증가하였으며, 주로 토양성분인 Mg, Al, Ca, Fe가 각각 6.16배, 8.06배, 7.64배 그리고 3.84배로 크게 증가하여, 이전의 분석결과와 비슷하였다¹¹.

2. PM₁₀이 WI-26 VA4 cell에서 ROS 발현에 미치는 영향

PM₁₀을 처리한 후 24시간 동안 배양한 세포에서는 PM₁₀이 50 μ g/ml일 때 의미 있게 ROS의 발현이 증가하였으며,

100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 ROS 발현이 증가하는 경향을 보였다 (Table 1, Figure 1A)(PM₁₀ 50 $\mu\text{g/ml}$ 270.3 \pm 181.9, $p=0.043$, PM₁₀ 100 $\mu\text{g/ml}$ 243.3 \pm 136.4, $p=0.083$, PM₁₀ control 123.6 \pm 61.6).

항산화제인 NAC를 첨가하고 24시간 배양한 표본에서 PM₁₀ 농도가 50 $\mu\text{g/ml}$ 였을 때 NAC에 의한 ROS 발현의

Table 1. ROS expression in WI-26 VA4 cells after 24 hours incubation with PM₁₀

24 h	ROS expression (Mean \pm SD)	p-value
PM ₁₀ concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
Control	123.6 \pm 61.6	
50	270.3 \pm 181.9	0.043
100	243.2 \pm 136.3	0.083

Table 2. ROS expression between PM₁₀ and PM₁₀ plus NAC in WI-26 VA4 cells incubation with PM₁₀

24 h-NAC	ROS expression (Mean \pm SD)	p-value
PM ₁₀ concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
Control	126.5 \pm 126.5	0.237
50	158.2 \pm 137.6	0.109
100	148.4 \pm 149.8	0.043

저하가 유의하게 나타났다(Table 2, Figure 1B)(PM₁₀ 50 $\mu\text{g/ml}$ 240.4 \pm 169.6, $p=0.043$, PM₁₀ control 165.5 \pm 147.1).

3. PM₁₀이 WI-26 VA4 cell에서 NF- κ B 발현에 미치는 영향

PM₁₀ 처리 후 24시간 동안 세포배양을 시킨 후 상층의 배지를 채취하여 Western blot 분석을 하였다. PM₁₀의 농도는 0, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 실험하였는데, 농도가 증가할수록 의미 있게 발현이 증가하는 소견을 보였다. NAC를 처리하지 않은 대조군과 처리한 군을 비교한 결과 유의하게 NF- κ B band의 밀도가 감소하였다(Figure 2).

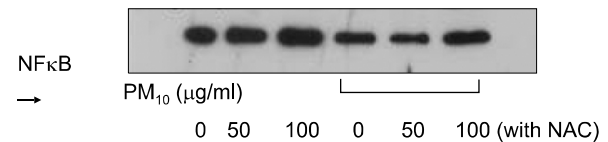


Figure 2. NF- κ B expression in WI-26 VA4 cells after 24 hours incubation with PM₁₀. The NF- κ B Levels were increased after exposed to PM₁₀, compared to those in NAC and control. NF- κ B expression increased after 24 hours of exposure to PM₁₀ in a dose-dependent manner.

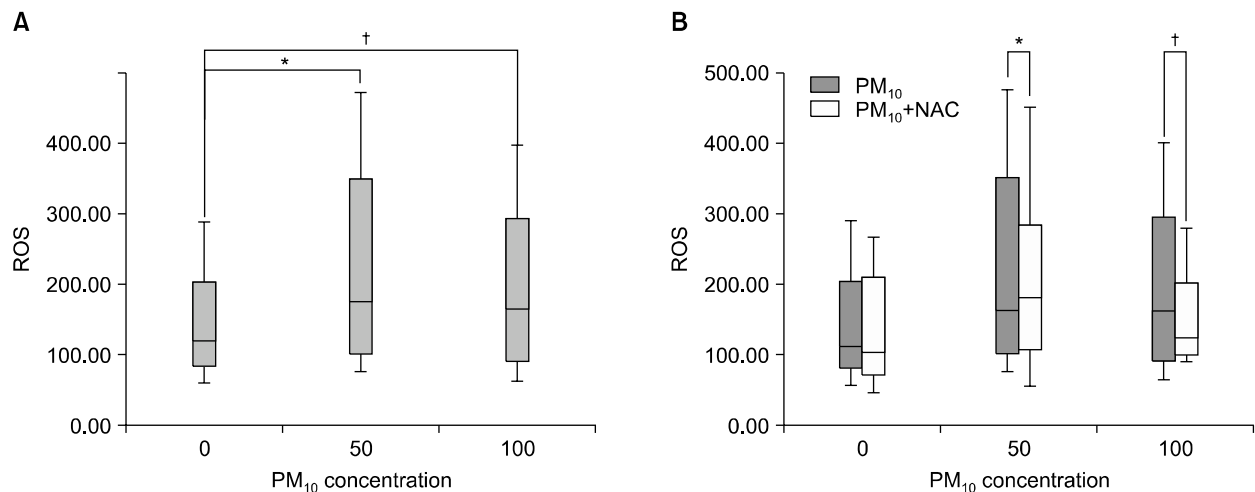


Figure 1. (A) ROS expression in WI26-VA4 cells after 24 hours. WI 26 cells were exposed to 0 to 100 $\mu\text{g/ml}$ of a suspension of ambient particulate matter with a diameter of less than 10 μm (PM₁₀). (B) ROS expression between control and NAC in WI26-VA4 cells. The ROS levels were increased after exposed to PM₁₀, compared to those in NAC and control. ROS expression increased after exposure to PM₁₀ in a dose-dependent manner (* $p<0.05$, $^{\dagger}p<0.1$).

Table 3. TGF- β expression in WI-26 VA4 cells after 24 hours incubation with PM₁₀

24 h	TGF- β expression (Mean \pm SD)	p-value
PM ₁₀ concentration (μ g/ml)		
Control	100.0 \pm 0.0	1.000
50	166.9 \pm 64.5	0.001
100	150.1 \pm 46.4	0.001

Table 4. TGF- β expression between PM₁₀ and PM₁₀ plus NAC in WI-26 VA4 cells incubation with PM₁₀

24 h-NAC	TGF- β expression (Mean \pm SD)	p-value
PM ₁₀ concentration (μ g/ml)		
Control	100.0 \pm 0.0	1.000
50	100.2 \pm 37.2	0.047
100	101.2 \pm 39.8	0.109

Table 5. Fibronectin expression in WI-26 VA4 cells after 24 hours incubation with PM₁₀

24 h	Fibronectin expression (Mean \pm SD)	p-value
PM ₁₀ concentration (μ g/ml)		
Control	100.0 \pm 0.0	1.000
50	115.1 \pm 21.3	0.209
100	130.1 \pm 20.3	0.001

4. PM₁₀이 WI-26 VA4 cell에서 TGF- β 발현에 미치는 영향

24시간 배양한 세포에서 이 중 50 μ g/ml과 100 μ g/ml에서 각각 유의하게 TGF- β 의 발현농도가 증가하였다 (PM₁₀ 50 μ g/ml 166.9 \pm 64.5% of control, PM₁₀ 100 μ g/ml 150.1 \pm 46.4% of control, $p=0.001$). 항산화제인 NAC를 처리한 표본에서는 PM₁₀ 50 μ g/ml에서만 의미 있게 TGF- β 발현이 감소하였다(PM₁₀ 50 μ g/ml 100.2 \pm 37.1% of control, $p=0.047$) (Table 3, 4, Figure 3).

5. PM₁₀이 WI-26 VA4 cell에서 fibronectin 발현에 미치는 영향

PM₁₀ 처리 후 24시간 배양한 세포에서는 100 μ g/ml에서 의미 있게 fibronectin 발현이 증가하였다(Table 5,

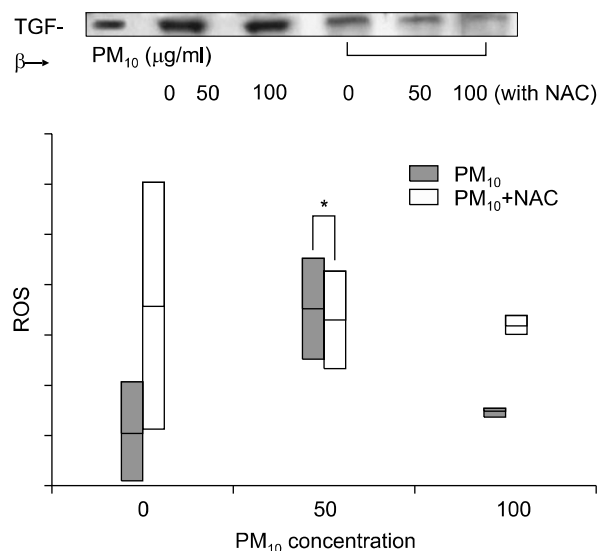


Figure 3. TGF- β expression in WI-26 VA4 cells after 24 hours incubation with PM₁₀. The TGF- β levels were increased after exposed to PM₁₀, compared to those in NAC and control. TGF- β expression increased after 24 hours of exposure to PM₁₀ in a dose-dependent manner (* $p < 0.05$).

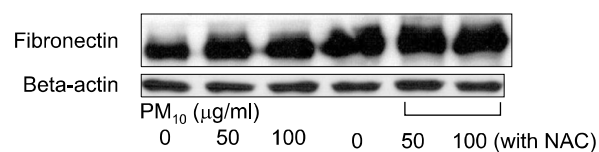


Figure 4. Fibronectin expression in WI-26 VA4 cells after 24 hours incubation with PM₁₀. The fibronectin levels were increased after exposed to PM₁₀, compared to those in NAC and control. fibronectin expression increased after 24 hours of exposure to PM₁₀ in a dose-dependent manner.

Figure 4). (PM₁₀ 100 μ g/ml 130 \pm 20.3%, $p=0.001$).

고 찰

호흡기에 대한 대기오염물질의 피해는 널리 알려져 왔고, 대기오염물질 중 미세먼지에 대한 피해가 가장 문제시 되는 것으로 알려져, PM₁₀의 건강에 대한 영향에 대해 관심이 증가되고 있다. 기존의 연구에 의하면 흡입이 가능한 크기의 미세먼지에 노출되는 양이 증가하는 것은 심폐 질환의 유병률과 사망률 증가에 강하게 연관되어 있다. 반대로, 대기가 정화될수록 사망률은 감소하게 된다.

미세먼지가 인체에 끼치는 유해성에 대한 기존의 연구들에서 천식과 만성폐쇄성폐질환과 같은 호흡기 질환의 유병률 증가 및 급성 악화의 빈도가 증가될 수 있다는 것이 증명되었다. 외국에서 이루어진 여러 역학적 연구에서 호흡기질환의 유병률과 사망률이 대기오염 입자 노출 기간과 연관되어 있다는 것이 밝혀졌고, 이러한 효과는 기존에 염증성 폐질환을 가지고 있던 사람에서 더 강하게 나타났다. HEI report (Health Effects Institute, USA)는 명확하게 다른 오염원이 아닌 대기중 미세먼지 농도 증가가 미국에서 사망률 증가를 일으켰다는 것을 보였다. 이 결과는 지역마다 달랐는데, 대기오염 빈도가 높은 북동쪽에서 가장 높았고 남서쪽에서 가장 낮았다¹².

국내에서도 오존, PM₁₀이 증가하는 경우 천식 발작 위험도가 증가한다는 연구와 이산화황과 총 부유분진(TSP)이 증가하면 소아 천식 발생의 빈도가 증가한다는 보고가 있다. 그리고 황사 현상이 일어나는 기간 중에 대기 중의 PM₁₀이 크게 증가하며, 이에 따라 기관지 천식환자의 호흡기 증상 악화를 유발할 수 있음이 밝혀진 바 있으며, 고농도의 PM₁₀에 만성적으로 노출되는 경우 폐암의 발생률이 증가하고 심혈관계질환의 위험성도 증가될 수 있다고 보고되었다¹³.

이러한 PM₁₀의 영향이 나타나는 기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않으나, 세포 및 동물을 대상으로 한 연구들에서 여러 가지 가능한 가설들이 제시되어 왔다¹². 미세먼지에 노출되면서 여러 가지 염증성 cytokine이 증가되어 염증을 일으킨다는 결과도 보고되었고¹⁴, PM₁₀입자 자체의 물리적 영향이나 내독소에 의한 것으로 추정되기도 하며^{15,16}, 입자 자체의 성질보다는 세포와 접촉하는 입자의 표면적에 비례하여 염증반응이 증가한다는 연구도 있다¹⁷.

본 연구의 결과는 기관지 상피세포인 WI-26, VA4에서 PM₁₀ 농도 50 μ g/ml, 100 μ g/ml에서 유의하게 ROS가 증가하는 소견을 보이면서 NF- κ B가 증가되는 소견을 나타냈고, 항산화제인 NAC를 처리하였을 때 ROS의 감소와 함께 NF- κ B의 감소 소견도 나타내어 ROS의 발현이 NF- κ B의 활성화에 직접 영향을 줄 수 있음을 관찰할 수 있었고, 이에 따라 TGF- β 나 fibronectin의 발현이 연관되어 증가됨을 확인할 수 있어 황사의 PM₁₀이 폐상피세포에서 ROS를 발생시켜 폐섬유화의 과정의 중요물질인 fibronectin의 발현을 촉발시킬 수 있음을 알 수 있었다.

기존의 연구에서 H₂O₂를 가한 신장 사구체 간세포나 세뇨관 상피세포에서 ROS가 증가하면서 TGF- β 가 증가된 결과와 비슷한 결과를 볼 수 있었다^{18,19}. 일반적으로

PM₁₀은 폐상피세포와 대식세포에 작용하여 세포 내에서 ROS의 생성이 증가하며, ROS는 인체의 세포 내에서 MAPKinase 등의 세포 내 신호전달체계를 통하여 NF- κ B나 activator protein 1 (AP-1)을 활성화시킬 수 있는 것으로 알려져 있으며, 전사인자인 NF- κ B와 AP-1은 세포 내 산화환원 상태에 의해 조절되어 여러 가지 유전자의 발현과 세포적 반응을 유도한다. NF- κ B에 의해 조절되는 유전자들은 IL-2, IL-6, TNF- α 등을 포함하는 여러 가지 전염증성 및 세포독성 cytokine들을 만들어낸다²⁰. 이러한 cytokine에는 MCP-1, MIP-2, TGF- β , PAI-1, TNF, IL-6, IL-8 등이 있는데, 이들에 의해 염증반응이 촉발되고 효소 등의 세포 내 단백질질이 변형될 수 있는 것으로 알려져 있다.

ROS가 TGF- β 를 증가시키는 기존에도 사람의 폐섬유아세포, 신장의 사구체 혈관간세포 및 세뇨관 상피세포 등을 대상으로 한 연구에서 증명되었다. 특히 폐 섬유아세포에서는 ROS가 TGF- β 의 세포 내 신호전달자뿐만 아니라 그 자체가 TGF- β 생성을 증가시킬 수 있는 것으로 알려져 있었으나, 어떤 요인들에 의해서 ROS가 증가하는지에 대한 연구는 미진한 편이었다²¹.

본 연구의 의하면 황사의 PM₁₀이 폐상피세포 내에서 ROS를 증가시키는 확실한 유발인자임을 증명하여, 미세먼지가 ROS 발생에 주요한 요인이 될 수 있을 가능성을 제시하였으며, 이로 인해 NF- κ B나 TGF- β 의 발현이 증가되고, 최종적으로 fibronectin이 증가하므로, 폐상피세포에서 시작된 반응이 연결한 폐간질조직에 영향을 미쳐 전반적인 폐섬유화 과정으로 연결될 가능성을 생각해 볼 수 있다.

그러나 PM₁₀에 의한 전반적인 폐장의 염증 및 섬유화반응은 추후 추가적인 동물실험 등을 시행하여 확인해 볼 필요가 있겠다.

Fibronectin 결과에서는 PM₁₀을 가한 군에서 대조군에 비해 50 μ g/ml, 100 μ g/ml에서 전반적으로 fibronectin이 증가하였으나, 이 중 100 μ g/ml에서만 유의하게 증가한 결과를 보였는데, 이는 fibronectin의 발현에서 ROS나 TGF- β 이외의 다른 fibrogenic cytokines 등이 직접적인 요인으로 작용했을 가능성이 있을 것으로 유추할 수 있다. 또한 ROS에 의해 NF- κ B가 증가하고, 이에 의해 TGF- β 와 fibronectin이 증가할 수 있는 것을 증명하였으나, 향후 중간과정을 확실하게 규명하기 위해서는 NF- κ B inhibitor 등을 이용하여 중간 경로를 차단한 뒤 그 결과를 비교해보는 것과 황사에 포함된 내독소(endotoxin) 등에 의해 세포가 어떤 영향을 받는지에 대한 추가적인 연구가

필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 황사는 동북아시아에서 자연 발생하는 현상으로, 지름 10 μm 이하의 미세먼지(particulate matter 10, PM_{10})를 다수 포함하여, 흡입하면 하부기관지 및 폐의 가스-교환부분까지 침착 가능하여 호흡기계에 손상을 일으킬 수 있다. 본 연구에서는 황사에 포함된 PM_{10} 을 기관지 상피세포에 작용시켜 활성산소 및 NF- κB , TGF- β , fibronectin이 증가 여부를 확인하고 섬유화의 신호경로를 규명하고자 하였다.

방 법: 공기포집기로 포집한 PM_{10} 입자를 추출하여 기관지 상피세포인 WI-26 VA4 cells (KCLB)에 PM_{10} 을 농도에 맞게 노출시켰다(0, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). ROS는 DCF-DA를 세포에 반응시킨 후 생성된 DCF를 FACScan을 이용해 측정하였다. TGF- β , fibronectin, NF κB 는 western blotting으로 분석하였다. 항산화제인 NAC를 이용하여 각 물질의 발현 억제 여부를 측정하였다.

결 과: PM_{10} 을 가했을 때 대조군에 비하여 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 ROS, TGF- β , fibronectin, NF κB 발현이 유의하게 증가하였고, 항산화제인 NAC를 처리한 세포는 ROS, TGF- β , fibronectin, NF κB 의 발현이 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의하게 감소하였다.

결 론: 황사의 PM_{10} 은 WI-26 VA4 cells에서 ROS 생성을 증가시키고 NF- κB , TGF- β , fibronectin 생성을 증가시켜 섬유화에 기여할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Chun YS. The Yellow-Sand phenomenon recorded in the Chosunwangjosilok. J Meteorol Soc Korea 2000;36: 285-92.
2. Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine particle. Occup Environ Med 2001;58:211-9.
3. Buschini A, Cassoni F, Anceschi E, Pasini L, Poli P, Rossi C. Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. Chemosphere 2001; 44:1723-36.
4. Dihl RR, da Silva CG, do Amaral VS, Reguly ML, de Andrade HH. Mutagenic and recombinagenic activity

- of airborne particulates, PM_{10} and TSP, organic extracts in the Drosophila wing-spot test. Environ Pollut 2008; 151:47-52.
5. Hong YH, Peng HB, La Fata V, Liao JK. Hydrogen peroxide-mediated transcriptional induction of macrophage colony-stimulating factor by TGF-beta1. J Immunol 1997;159:2418-23.
6. Junn E, Lee KN, Ju HR, Han SH, Im JY, Kang HS, et al. Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF-beta 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca^{2+} in TGF-beta 1-induced IL-6 expression. J Immunol 2000;165:2190-7.
7. Hagiwara SI, Ishii Y, Kitamura S. Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:225-31.
8. Kim JH, Jeon HK, Kim MK, Kyung SY, An CH, Lee SP, et al. Particulate matter from Asian dust storms induces the expression of proinflammatory cytokine in A549 epithelial cells. Tuberc Respir Dis 2006;60:663-72.
9. Jimenez LA, Thomson J, Brown D. PM_{10} particles activate NF- κB in alveolar epithelial cells. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:A27.
10. Hwang HJ, Kang SJ, Kang SE, Park YM, Kim HK, Roh CU. Single particle characterization of aerosol samples collected during Asian dust storm events and non-Asian dust period in Incheon. In: Proceedings of the 2007 Environmental Societies Joint Conference; 2007 May 2-4; Busan, Korea. Seoul: Korean Society for Atmospheric Environment; 2007. p. 179-82.
11. Baek KW, Chung JD. Study on the yellow sandy dust phenomena in Korean peninsula and chemical compositions in fine particles at background sites of Korea. Korean J Sanitation 2004;19:9-18.
12. Gonzalez-Flecha B. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. Mol Aspects Med 2004;25:169-82.
13. Ha EH. Effects of Asian dust storm on health. The magazine of the Society of Air-conditioning and Refrigeration Engineering of Korea 2006;35:21-5.
14. Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. Ann Ist Super Sanita 2003;39:405-10.
15. Long CM, Suh HH, Kobzik L, Catalano PJ, Ning YY, Koutrakis P. A pilot investigation of the relative toxicity of indoor and outdoor fine particles: in vitro effects of endotoxin and other particulate properties. Environ Health Perspect 2001;109:1019-26.
16. Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E,

- Martínez L, García-Cuellar C, Ponce-de-León Rosales S, et al. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect* 2003;111:1289-93.
17. Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;175:191-9.
 18. Jiang Z, Seo JY, Ha H, Lee EA, Kim YS, Han DC, et al. Reactive oxygen species mediate TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:961-6.
 19. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:S241-5.
 20. Vallyathan V, Shi X. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environ Health Perspect* 1997;105 Suppl 1:165-77.
 21. Ha H, Yu MR, Uh ST, Park CS, Lee HB. Role of reactive oxygen species in transforming growth factor - beta1 - induced fibronectin secretion and alpha - smooth muscle actin expression in human lung fibroblasts. *Tuberc Respir Dis* 2005;58:267-75.
-