

미세분진이 흰쥐의 폐포대식세포에서 Nitric Oxide 생성 및 iNOS 발현과 Nitrotyrosinated-protein의 형성에 미치는 효과

¹건국대학교 수의과대학, ²가톨릭의과대학, ³국립수의과학검역원

최봉희¹, 리천주¹, 이수진¹, 박세종¹, 임 영², 김경아², 장병준¹, 이종환¹, 이명현³, 최능훈¹

The Effects of air-borne particulate matters on the Alveolar Macrophages for the iNOS Expression and Nitric Oxide with Nitrotyrosinated-proteins Formation

Feng Ji Cui¹, Tian Zhu Li¹, Soo-Jin Lee¹, Se-Jong Park¹, Young Lim², Kyung-A Kim², Byung-Joon Chang¹, Jong-Hwan Lee¹, Myoung-Heon Lee³, Nong-Hoon Choe¹

¹College of Veterinary Medicine, Konkuk university, Seoul. ²Catholic University College of Medicine, Seoul.

³National Veterinary Research and Quarantine Service

Background : Particulate matters (PM) when inhaled is known to induce pulmonary diseases including asthma and chronic bronchitis when inhaled. Despite the epidemiological proof evidence, the pathogenesis of PM-related pulmonary diseases is unclear remain poorly understood.

Methods : Primary alveolar macrophages were harvested from the SPF and inflammatory rats by bronchioalveolar lavage (BAL). The cultured primary alveolar macrophages were treated with the medium only, PM only (5~40 μ g/cm²), LPS (5ng/ml) only, and PM with LPS for 24 and 48 hours. The level of secreted nitric oxide (NO) was assayed from the cultured medium by using the Griess reaction. The cultured cells were utilized for the western blotting against the inducible nitric oxide synthase (iNOS) proteins. Immunocyto-chemical staining against the iNOS and NT-proteins were performed in cells that cultured in the Lab-Tek[®] chamber slide after treatments.

Results : The PM that utilize in this experiments induced NO formation with iNOS expression in the cultured SPF and inflammatory rats alveolar macrophages, by itself. When the cells were co-treated with PM and LPS, there was a statistically significant synergistic effect on NO formation and iNOS expression over the LPS effect. The cells from the sham control showed minimal immunoreactivity for the NT-proteins. Significantly higher quantities of NT-proteins were detected in the PM and PM with LPS co-treated cells than from the sham control.

Conclusion : Increased iNOS expression and NO formation with increased NT-proteins formation might be involved in the pathogenesis of PM-induced lung injury.

(*Tuberc Respir Dis* 2006; 60: 426-436)

Key words : Particulate matter (PM), Rat lung alveolar macrophages, Nitric oxide (NO), Inducible nitric oxide synthase (iNOS), Nitrotyrosinated-protein.

서 론

최근 세계적으로 대도시들은 심각한 대기오염에 시달리고 있다¹. 대기오염물질의 한 종류인 미세분진 (particulate matter, PM)은 비교적 장기간 대기 중에

체류하기 때문에 지속적인 노출로 인한 사람에서의 피해가 우려된다. 특히 염증성 호흡기질환 및 기관지 천식이 있는 사람들의 경우 PM의 흡입은 지속적인 기침을 유발하고 전체적인 호흡기의 기능을 저하시켜 질환을 더욱 악화시키는 것으로 알려져 있다². 근래 들어 자동차 수의 급격한 증가와 빈번한 건축 및 토목공사로 인하여 많은 양의 배기가스와 분진이 대기 중으로 배출되어 도로변의 대기오염은 날로 심각해지고 대도시의 도로변에 고층건물과 상가가 밀집되어 있어 발생한 대기오염물질이 정제될 가능성도 커 대도시 시민들의 건강장해는 지속적으로 증가될 것으로 예상된다. 국내 대도시의 공기 중에 부유하는

Address for correspondence : Nong-Hoon Choe, PhD.
Konkuk University College of Veterinary Medicine 1
Hwa-yang dong, Gwang-jin gu, Seoul
Phone : 02-450-3709 Fax : 02-450-3037
E-mail : nojamaji@hanmail.net
Received : Dec. 13. 2005
Accepted : Apr. 3. 2006

미세먼지의 발생원으로는 석탄 및 석유의 연소, 폐기물 소각, 자동차의 수송과 타이어의 마모, 시멘트 제조, 금속의 연마 및 분쇄 등을 들 수 있으며, 먼지 속에 함유된 위해 성분으로는 석면, 각종 중금속, 발암성이 있는 것으로 알려진 탄화수소류(예: polycyclic aromatic hydrocarbons의 benzopyrene)와 각종의 화학성 산화물질 등이 있다.

Nitric oxide (NO)는 생체 내에서 기질인 L-arginine이 nitric oxide synthase (NOS)의 작용으로 citrulline과 함께 생성되며, NOS에는 constitutive nitric oxide synthase (cNOS)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 있다. cNOS는 혈관내피세포 등에서 일정한 수준으로 발현되어 생리적인 기능에 필요한 낮은 농도의 NO를 지속적으로 생성하는 반면, iNOS는 상피세포나 백혈구 등에서 lipopolysaccharide (LPS) 나 각종 cytokine 등에 의하여 발현이 유도되어 과량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있어 염증반응시의 NO 생성은 대부분 iNOS에 의한 것이라 할 수 있다³⁴. 생체 내에서 과량으로 생성된 NO는 미토콘드리아의 기능 억제, FeS 함유 효소기능 저하, DNA 손상유발 및 각종 효소의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁹. 폐포대식세포는 폐의 상피에 상주하는 세포로서 폐의 방어기전에 있어서 일차적인 역할을 담당하며, 염증부위에서 활성화된 세포는 각종의 cytokine뿐 아니라 arachidonic acid의 대사물과 활성산소 및 NO 등을 대량으로 생성하여 염증매개에 일정한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다¹⁰.

미세분진들에 의한 폐 질환의 유발과 그와 관련된 위해작용의 기전들에 관하여는 부분적으로 많은 연구들이 진행되고 있다. 그러나 현재까지 대도시 대로변에서 채취된 복합적인 미세분진이 정상적인 흰쥐의 폐포대식세포와 폐렴증상이 있는 흰쥐의 폐포대식세포에서 염증반응이 일어날 때 형성되는 것으로 알려진 NO와 NO를 형성하는 iNOS의 발현 및 NO에 의하여 생성이 증가되는 nitrotyrosinated-proteins의 발현에 미치는 영향에 관하여는 보고된 적이 없어 본 연구에서는 그러한 의문들을 규명하고자 본 연구를

수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

SPF Sprague-Dawley계 흰쥐(300g, ♂) 40마리를 (주)샘타코에서 구입하고, 중앙실험동물(주)에서 제조한 사료를 물과 함께 자유롭게 급식시키는 상태에서 실험동물전용 사육실에서 사육하였다.

2. 실험시약 구입

DMSO는 GIBCO[®]에서 구입하였고, iNOS antibody는 Transduction Laboratories(Lexington[®], KY)에서, nitrotyrosine antibody는 Upstate Bio-technology(Lake Placid[®], NY)에서 각각 구입하였다. LPS (E.Coliserotype O55:B5), RPMI-1640 medium, 면역화학염색법의 발색을 위한 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) 등의 일반시약은 모두 Sigma사 제품을 사용하였다.

3. PM 시료의 확보 및 전처리

PM시료(total precipitated particles)는 서울시 광진구 화양동의 전철 2호선 건대입구역으로부터 구의역 사이의 대로변 주위 건축물에 쌓여있는 것을 30곳 이상의 장소에서 지상 1.2m 이상 높이의 자연 낙하된 미세먼지를 선별하여 2002년 가을(9월~11월)에 수시로 채취하였다. 채취한 PM시료는 수분 및 오염 가능성이 있는 생물학적 요인의 완전한 제거를 위하여 고온건조기내에서 250℃에서 2시간 가열건조 후 밀봉하여 냉동 보관하였다. PM시료는 필요한 경우, 0.05% DMSO와 10% FBS가 포함된 RPMI-1640 medium에 적정농도로 희석하여 초음파분쇄기로 30초 동안 3번씩 분쇄한 후 실험에 사용하였다.

4. 폐포대식세포의 분리 및 배양

Ketamin과 Xylazine (Rumpun[®])을 1:5로 혼합하여 0.5 ml/200g B.W로 흰쥐의 복강 내로 주사하여 마취하였다. 70% 알콜로 흰쥐의 피부를 완전히 소독한 후 10ml의 일회용 주사기(21G needle)를 사용하여 배대 동맥을 통하여 완전히 사혈하였다. 경부기도를 1/2정도 절개하고 18-gauge cannula를 넣고 단단히 고정 한 후 기관지폐포세척술(bronchioalveolar lavage, B-AL; with 37°C Ca²⁺ & Ma²⁺ free PBS, 6ml x 5회)을 시행하여 폐포대식세포를 채취하였다. 채취한 폐포대식세포를 600rpm에 5분 동안 원심 분리하여 회수하였고, 일부의 세포들에 대하여 cytospin[®] 기계를 이용하여 슬라이드에 세포를 부착시킨 후 감별염색(Diff-Quik[®] stain kit)을 실시하여 염증성 세포가 전혀 발견되지 않은 시료와 호중구가 5% 이상인 염증성 시료를 별도로 분리하여 실험에 각기 사용하였다.

분리된 폐포대식세포는 RPMI-1640 medium (with 10% FBS)을 사용하여 12 well plate (0.5 × 10⁶/well/ml)에 loading한 후 2시간 동안 전배양(37°C, 5% CO₂ with 95% air)을 실시하였다. 전배양을 마친 세포들에서 상층액을 제거한 후 실험설계에 따라 준비된 처리용액을 투여하였다.

5. 폐포대식세포의 배양액에서 NO₂⁻의 측정

RPMI-1640 medium을 음성대조군(n=4)으로, LPS (5ng/ml)를 양성대조군으로, 처치군I에서는 PM이 농도별(5, 10, 20 µg/cm²)로 분산된 용액을 설정하였고, LPS와 PM 혼합용액을 처치군II로 설정하였다. 실험을 위한 각 세포들은 세포배양기내에서 실험설계에 따라 일정시간 배양하였고, 배양 후 상층의 배양액을 분리하여 1.5ml tube에 담아 냉장보관 후 NO₂⁻의 분석에 사용하였다. 시료 내 NO₂⁻의 측정은 Griess reaction방법을 통하여 정량적으로 분석하였다.

6. 세포의 면역화학염색법

각 처치에 따른 폐포대식세포에서 iNOS 및 nit-

rotyrosilated-proteins 발현정도를 면역화학염색법을 통하여 확인하기 위해 순수 분리된 세포들을 4 well Lab-tek[®] chamber slides에서 배양 (0.3 × 10⁶cells/well/ml)하였다. 각 처치군의 설정 및 처치배양액의 제조는 NO₂⁻ 측정을 위한 실험법에서와 동일하였다. 실험을 위한 각 chamber는 세포배양기 내에서 48시간 배양하였고, 세포배양 후 chamber내의 상층액은 버리고 즉시 10% 포르말린용액에 세포가 부착된 slides를 담가 5분간 고정시킨 후 건조시켜 4°C에서 냉장 보관하였다. 면역화학염색은 고정시킨 chamber slides를 TBS에 5분간 수세하고, 내인성 peroxidase activity를 억제하기 위하여 3%의 과산화수소 용액에 15분간 처리하였다. 그 후 1%의 bovine serum albumin (BSA)에 30분간 처리한 후, anti-iNOS protein antibody (10 µg/ml)와 anti-nitrotyrosilated protein antibody (10 µg/ml)를 별도의 시료에 각기 2시간동안 상온에서 처리하였다. 2차항체는 DAKO LSBA[®] 2 kit anti-mouse와 anti-rabbit Ig를 각각 30분간 처리하고, DAKO LSBA[®] 2 kit HRP에서 30분간 처리한 후 DAB를 사용하여 발색시켰다. Slide glass를 완전히 건조시킨 후 Harris's hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 각 군의 항체의 발현정도는 임의로 선정된 세 곳에서 각기 100개의 세포를 세었을 때 발색되는 세포수를 백분율로 나타내었다.

7. Western blotting

폐포대식세포를 6 well culture plates에 1.5 × 10⁷/well의 수로 loading하고, RPMI-1640 medium (10% FBS)으로 세포배양기 내에서 2시간 배양하였다. 단백질 분리를 위한 각 처치군의 설정 및 세포배양액의 조성은 NO₂⁻ 측정을 위한 실험에서와 동일하게 제조하였다. 24시간동안 세포를 배양한 후 cell culture plates를 PBS로 씻어낸 후 RIPA-B buffer (0.5% Nonidet P-40, 20mM Tris PH 8.0, 50mM NaCl, 50mM NaF, 100uM Na₃VO₄, 1mM DTT, 50 µg/ml PM-SF)를 투여하고 4°C에서 30분간 보관하였다. 그 후 세포추출용액을 4°C 12,000rpm에서 20분간 원심분리를 실시하여 단백질을 분리하였고, Bradford m-

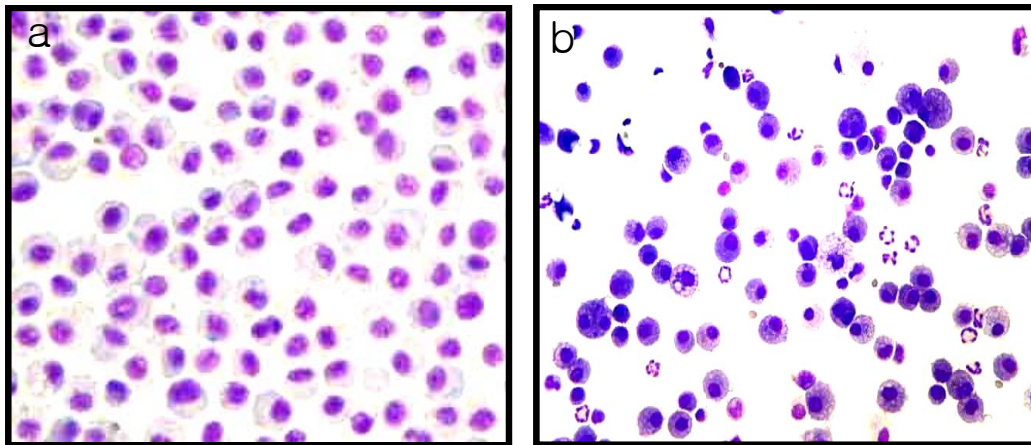


Figure 1. Composition and morphology of BAL cells ($\times 400$). Diff-Quick stained alveolar macrophages from the SPF rat (a) and from the inflammatory rat (b).

Table 1. Composition from the SPF rat and Inflammatory rat in the BAL cells (%)

	Macrophage	Neutrophil	Lymphocyte
SPF Rat (n=6)	99.4 \pm 0.7	0.6 \pm 0.8	0.0 \pm 0.0
Inflammatory Rat (n=6)	87.5 \pm 1.9	12.8 \pm 1.7	0.4 \pm 0.5

ethods를 이용하여 정량하였다. 분리된 단백질은 15% SDS-PAGE gel을 사용하여 전기영동을 실시하였고 nitrocellulose transfer membrane으로 옮긴 후 5% skim milk로 blocking을 실시하였다. 1차 항체로는 anti-iNOS protein antibody 및 anti-nitrotyrosilated protein antibody를 별도의 nitrocellulose transfer membrane에 처리하였고, 10분씩 3번 수세하였다. 다음 2차 항체를 처리하여 ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 단백질의 band를 확인하였다.

8. 통계학적 분석

통계 프로그램인 SPSS 10.0을 사용하여 실험설계에 대한 분산분석은 ANOVA로 검정하였고, 각 처치군 간의 비교는 student t-test를 실시하였다. 각 처치군은 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과를 Mean \pm SEM으로 표시하였고, $P < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 실험에 사용한 SPF 흰쥐와 폐렴증상의 흰쥐에서 BAL cell의 분석

(Fig. 1-a)는 SPF 흰쥐에서, (Fig. 1-b)는 폐렴증상이 있는 것으로 추정되는 흰쥐에서 BAL를 실시하여 분리한 폐포내세포를 Diff-Quik[®] stain을 실시한 결과이다. SPF 흰쥐에서 분리된 세포의 조성은 평균 98% 정도가 폐포대식세포였으나, 폐내 염증이 있는 것으로 추정된 흰쥐에서 분리한 세포에서는 다수의 호중구 및 임파구가 확인되었고, 대식세포의 크기에도 큰 차이가 있었다.

(Table 1)은 cytopsin[®] 기계를 사용하여 slide glasses에 세포를 부착시켜 건조시킨 후 감별염색(Diff-Quik[®] staining)을 실시하고, 광학현미경 ($\times 400$)하에서 임의로 3곳을 선정하고 연속적으로 100개의 세포를 세었을 때 계수된 세포의 수를 백분율로 표시한 것이다 (Mean \pm SEM; n = 6). SPF 흰쥐에서 분리된

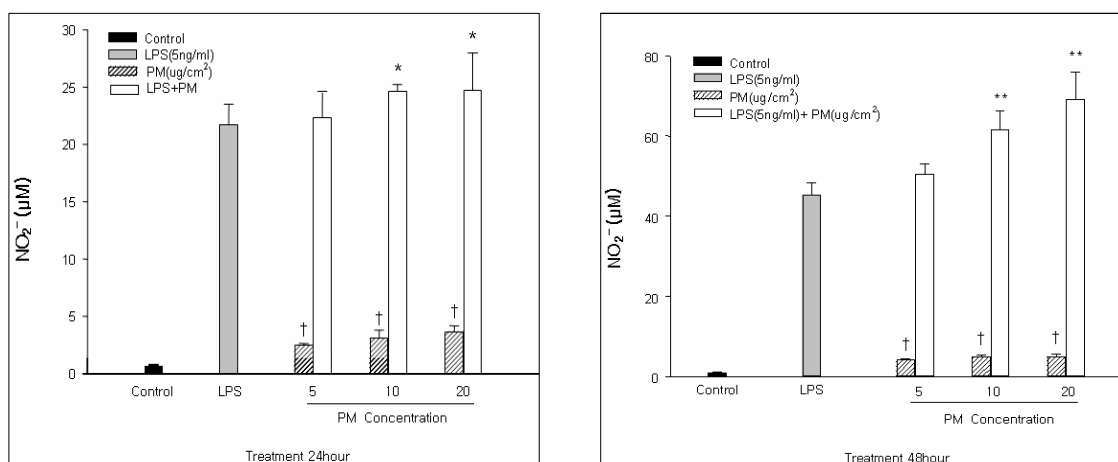


Figure 2A. Treatment-response relation for NO₂⁻ formation in cultured SPF rat alveolar macrophages at 24 hours. Cells were cultured with medium only (sham control), LPS (5ng/ml), various concentrations of PM (5, 10, 20 μg/cm²) and various concentrations of PM with LPS.

*P<0.05 versus LPS; †P<0.01 versus control. Mean ± SEM of four independent experiments per category (each experiment's n=3).

Figure 2B. Treatment-response relation for NO₂⁻ formation in cultured SPF rat alveolar macrophages at 48 hours. Cells were cultured with medium only (sham control), LPS (5ng/ml), various concentrations of PM (5, 10, 20 μg/cm²) and various concentrations of PM with LPS.

**P<0.01 versus LPS; †P<0.01 versus control. Mean ± SEM of four independent experiments per category (each experiment's n=3).

세포의 조성은 평균 99.4% 정도가 대식세포이고 0.6%가 호중구였으나, 폐내 염증이 있는 것으로 추정된 흰쥐에서 분리한 세포의 조성은 평균 87.5%가 대식세포이고, 12.8%가 호중구, 0.4%가 임파구로 확인되었다.

2. PM 노출이 NO₂⁻ 형성에 미치는 효과 I: 투여용량과 반응

PM 단독투여(5-20 μg/cm²) 후 24시간 동안 세포를 배양하고, 배양된 배지에서 NO₂⁻를 측정된 결과 모든 처치군에서 NO₂⁻의 생성이 확인되었다. 이러한 효과는 본 연구에서만 확인된 것으로 아주 특이적이라 할 수 있다. 투여된 미세분진의 농도가 증가함에 따라 NO₂⁻의 형성이 비례하여 증가하였으나, 그 증가도가 통계학적으로 유의하지는 않았다. 양성 대조군으로 설정한 LPS (5ng/ml)를 단독으로 투여하였을 때에는 최고 21.72±1.79 μM의 농도에서 NO₂⁻의 형성이 확인되었고, LPS와 PM을 병용하여 투여하였을 때에는

PM이 10-20 μg/cm² 함유된 처치군에서 LPS를 단독으로 투여하였을 때보다 NO₂⁻의 형성이 상승적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 2A). 세포의 배양시간을 48시간으로 늘리고 기타의 실험조건은 24시간에서와 같게 실시하였을 때의 결과는 NO₂⁻의 농도만 증가하였을 뿐 전체적인 경향은 24시간에서의 결과와 유사하였다(Fig. 2B).

3. PM 노출이 NO₂⁻ 형성에 미치는 효과 II: 투여시간과 반응

대조군(sham control), PM 단독, LPS 단독 및 LPS와 PM의 병용투여 후 시간의 경과(12-48시간)가 NO₂⁻의 형성에 미치는 효과를 측정하였다. 정상적인 세포배양배지를 투여한 대조군에서는 실험이 실시된 전 시간대의 시료들에서 NO₂⁻가 검출되지 않았으나, PM (20 μg/cm²)이 단독으로 처치된 모든 시료들에서는 NO₂⁻의 생성이 확인되었다. 각 시료에서 측정된 농도는 배양시간의 증가와 비례하여 통계적으로 유의하

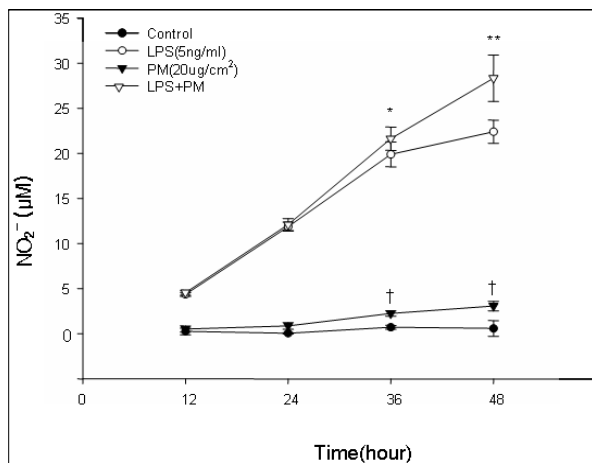


Figure 3. Time-response relation for NO_2^- formation in cultured SPF rat alveolar macrophages. Cells were cultured with medium only (control), LPS only, PM only and PM with LPS for 12–48 hours. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus LPS; † $P < 0.01$ versus control. Mean \pm SEM of four independent experiments per category.

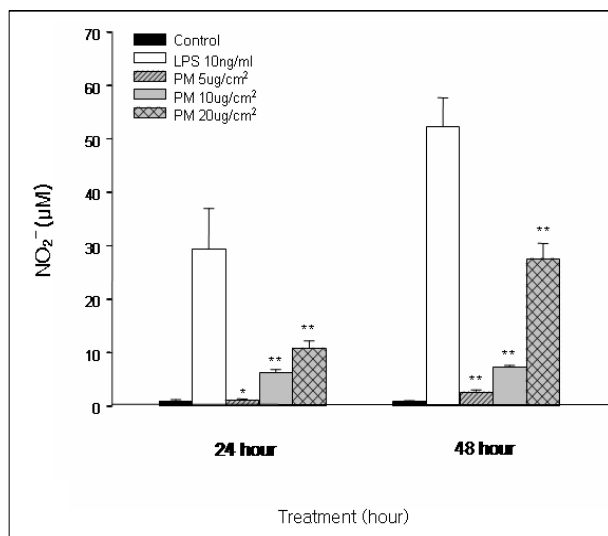


Figure 4. Treatment-response relation for NO_2^- formation in cultured inflammatory BAL cells. Cells were cultured with medium only, LPS (10ng/ml) only and various concentrations of PM (5–20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 24 hours and 48 hours. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control. Mean \pm SEM of four independent experiments per category.

게 증가되었다($P < 0.05$). 양성대조군(positive control)으로 설정하여 LPS (5ng/ml)만을 단독으로 투여한 처리군은 전 시간대에 걸쳐 높은 농도로 NO_2^- 를 형성하였고, 생성되는 농도는 배양시간의 증가와 비

례하여 유의하게 증가되었다($P < 0.01$). LPS에 감작된 세포에서 PM의 노출이 NO_2^- 형성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 LPS와 PM을 병용으로 투여한 처리군에서는 전 시간대에서 걸쳐 높은 농도로 NO_2^- 를 형성하였고, 측정된 농도는 배양시간의 증가와 비례하여 유의하게 증가되었다($P < 0.01$). 특히, LPS (5ng/ml)를 단독으로 투여하였을 때보다 PM과 병용하여 투여하였을 경우에 모든 시간대에서 NO_2^- 생성이 유의하게 상승되는 효과가 있었다(Fig. 3).

4. 배양된 대식세포(염증성 흰쥐)에서 PM 노출이 NO_2^- 의 형성에 미치는 효과: 투여용량과 반응

각 흰쥐들에서 BAL을 개별적으로 실시하였고, 확보된 모든 시료들에 대하여 별도의 Diff-Quik[®] stain을 실시하였다. 염색 후 현미경을 이용한 검사에서 호중구와 임파구의 비율이 전체 세포에서 5%를 상회하는 시료는 세포를 추출한 흰쥐의 폐 내에 자연적인 원인에 의하여 폐내 염증성반응이 존재하였던 것으로 간주하고 별도의 실험에 사용하였다. PM은 5–20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 농도범위에서 투여하였고, 시료는 24시간과 48시간 배양 후 각기 별도로 채취하였다. 각 시료에서 측정된 NO_2^- 의 농도를 (Fig. 4)에 나타내었다. 생성된 NO_2^- 의 농도는 24시간과 48시간의 시료 모두에서 투여되는 PM의 농도와 비례하여 유의하게 증가되었고, 또한 대조군과 비교하였을 때 모든 처리군에서 NO_2^- 를 형성이 유의하게 증가하였다.

5. iNOS 및 nitrotyrosinated-protein의 세포면역화학염색법

Lab-Tek[®] chamber slide에서 배양된 폐포대식세포에 각 처치에 따른 세포배양 후 세포면역화학염색을 실시하였고, 그 결과를 (Fig. 5)와 (Fig. 6) 및 (Table 2)에 각각 나타내었다. 광학현미경하에서 iNOS의 발현정도를 관찰한 결과 대조군 (Fig. 5-a)에서는 관찰할 수 없었지만, LPS를 처리한 양성대조군 (Fig. 5-b)과 PM 처리군 (Fig. 5-c) 및 LPS와 PM 병합처리군 (Fig. 5-d)에서 발현을 관찰할 수 있었다. 각 처치

Table 2. Proportion(%) of iNOS and nitrotyrosilated-protein (NP) in cultured alveolar macrophages after treatment with medium only, LPS (5ng/ml) only, PM (20 μ g/cm²) only and PM with LPS for 48 hours.

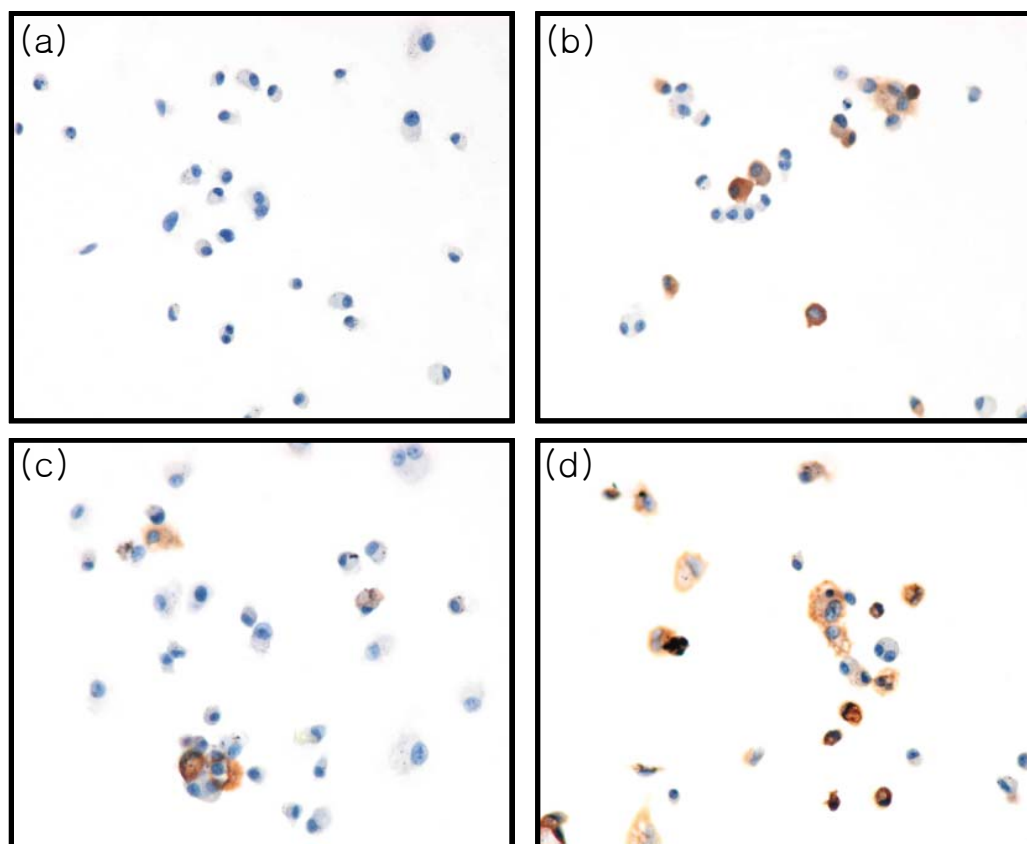
	Control	LPS	PM	LPS+PM
iNOS	0.3 \pm 0.6	34.0 \pm 2.7	5.7 \pm 2.1 *	70.0 \pm 2.0**†
NP	3.0 \pm 1.0	55.7 \pm 2.4	5.7 \pm 1.5	85.3 \pm 2.2**†

* P<0.05 versus control; **P<0.01 versus control.

† P<0.01 versus LPS. (each experiment's n=3, Mean \pm SEM).

군에 따른 iNOS의 발현정도를 %로 환산한 결과 PM 및 LPS단독으로 처리한 처리군에서는 5.7 \pm 2.1%, 34.0 \pm 2.7%로 iNOS protein의 발현이 확인되었고, LPS와 PM을 함께 처리한 실험군에서는 iNOS의 발현율이 LPS를 단독으로 처리한 실험군보다 증가하여 70%를 상회하는 높은 양성반응을 보였다. 이러한 결과는 NO₂⁻의 측정결과와 일치하는 것으로, NO₂⁻ 형성과 iNOS의 발현과는 직접적인 상관관계가 있음을 입증하는 것이라 할 수 있다.

각 처리군에 따른 nitrotyrosilated-protein의 발현 정도는 (Fig. 6)와 같았다. 음성대조군 (Fig. 6-a)에서는 일부의 세포가 양성반응을 보였고, PM 처리군 (Fig. 6-b) 및 LPS단독 처리군 (Fig. 6-c)과 LPS와 PM을 혼합 처리한 처리군 (Fig. 6-d)에서는 발현의 정도가 각기 증가되어 형성되었음을 확인할 수 있었고, iNOS와 nitrotyrosilated-protein 발현정도를 면역화학염색법으로 실시하여 각 군의 항체의 발현정도를 광학현미경 (\times 400)하에서 임의로 3곳을 선정하

**Figure 5.** Immunocytochemical stain for iNOS in the cultured rat alveolar macrophages (\times 400). Cells were cultured with (a) medium only, (b) LPS (5ng/ml) only, (c) PM(20 μ g/cm²) only and (d) LPS with PM for 48 hours.

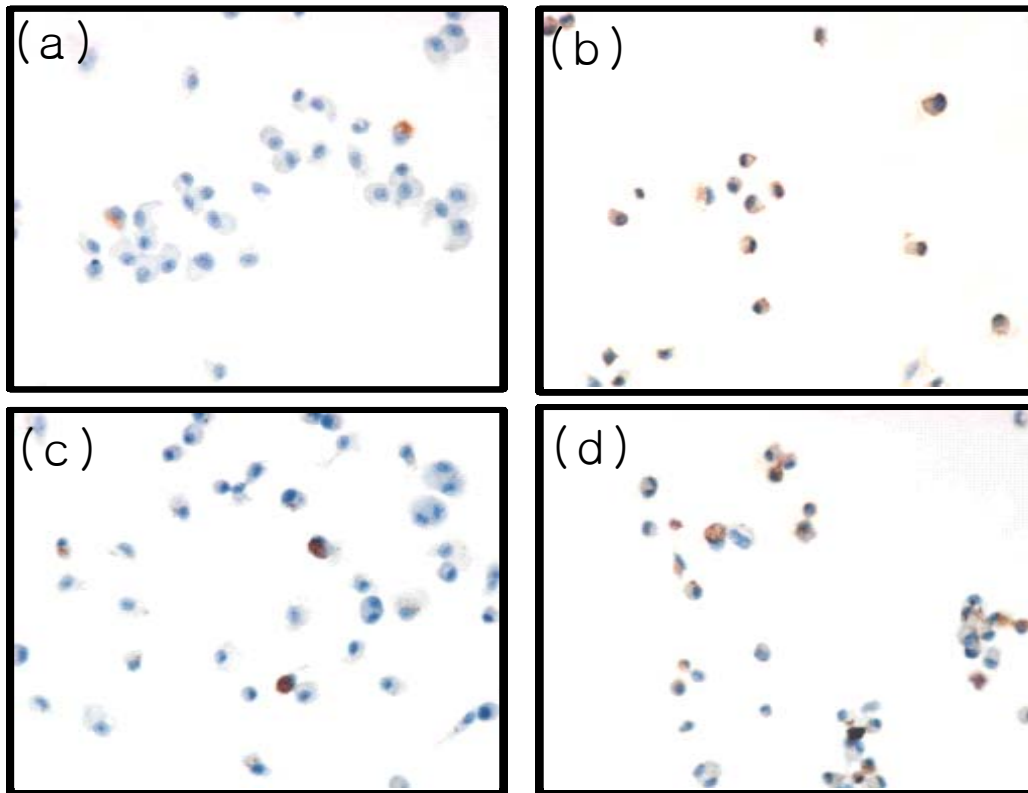


Figure 6. Immunocytochemical stain for nitrotyrosinated-protein (NP) in cultured rat alveolar macrophages ($\times 400$). Cells were cultured with (a) medium, (b) LPS (5ng/ml), (c) PM ($20\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and (d) LPS with PM ($20\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 48 hours.

여 연속적으로 100개의 세포를 세었을 때 발색되는 세포의 수를 백분율로 표시한 (Mean \pm SEM; n = 3)

결과는 (Table 2)에 나타내었다.

6. iNOS의 Western Blotting

면역염색의 결과를 검증하기 위하여 iNOS의 발현 정도를 western blot으로 확인하였다. 그 결과 대조군의 시료에서는 iNOS가 전혀 검출되지 않았으나 PM (5 and $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 처리군에서는 아주 미약하게 발현되었고, LPS 단독 및 LPS와 PM이 함께 처리된 투여군에서는 아주 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

고 찰

최근의 많은 역학적 연구들은 대기 중에 부유하는 미세먼진에 의한 사망과 질환의 증가를 일관되게 보

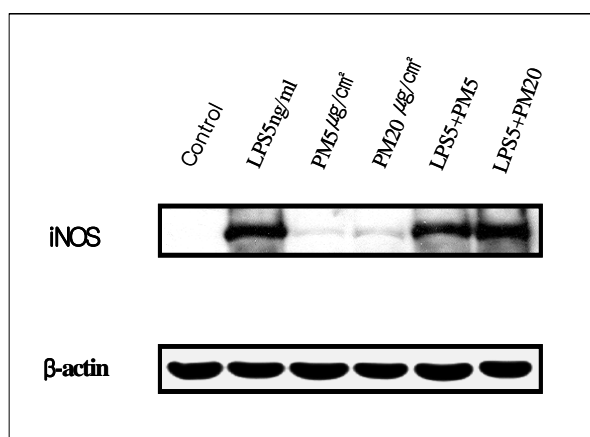


Figure 7. Western blot for iNOS in cultured rat alveolar macrophages. Cells were cultured with medium only, LPS only, PM only and PM with LPS for 24 hours. The level of β -actin was similar in all of the tested samples.

고하고 있고, 특히 눈, 피부, 심혈관계 및 호흡기계 질환(천식, 만성기관지염 및 폐렴 등) 등이 공기 중 미세분진의 증가에 따라 발생률이 증가하였다고 발표하였다^{1,2}. 미국 6개 도시 거주자 8,000여 명을 대상으로 16년 동안의 사망률과 도시오염도와와의 상관관계를 비교하였는데, 입자상물질의 오염도가 높을수록 사망률도 거의 정비례하게 증가한다고 보고되었다¹¹. 또한 DNA의 손상과 유전적 다형현상(genetic polymorphisms)이 PM₁₀ (particulate matters <10 μ m)의 오염도가 높은 곳에서 더 높게 발생한다고 보고되었고¹², 공기 중에 부유하는 분진(total suspended particulate)중 각종질환의 유발에 직접적인 원인이 되는 것은 PM₁₀ 이하의 아주 작은 미세분진으로 알려져 있으며¹³, 특히 경유 자동차에서 집중적으로 배출되는 디젤분진(diesel exhaust particles, DEP)이 가장 유해한 것으로 보고되고 있다¹⁴. 이러한 연구결과들은 교통량이 많고 인구밀집도가 높은 한국의 대도시 지역에서 발생하는 입자성 미세분진을 일반시민들이 장기적으로 흡입할 경우에는 건강한 사람들에게는 새로운 호흡기 질환이 유발될 가능성을, 그리고 기존의 각종 호흡기환자들이 흡입할 경우에는 임상증상을 더욱 악화시키고 치료를 어렵게 할 가능성이 있음을 간접적으로 의미한다고 할 수 있다.

PM의 흡입은 호흡기내 각종 세포들에서 cytokines과 chemokines의 생성에 변화를 유발하여 면역력에 직접적인 영향을 주고 ICAM-1과 같은 adhesion molecule의 발현을 증가시키고, iNOS와 같은 효소의 발현에도 영향을 미치고, superoxide나 hydroxyl radical과 같은 oxidants생산에도 관여한다고 한다¹⁵. NO는 생체내에서 면역작용의 매개와 혈관확장 및 신경전달물질로서 의 생리적기능 이외에 염증성 반응이 진행되는 세포나 조직에서는 과량으로 생성되어 직접·간접적으로 여러 종류의 효소작용을 억제하고, superoxide anion (O_2^-)과 반응하여 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 형성하여 보다 강력한 세포독성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구는 본 연구자가 근무하는 대학주변의 대로변에서 발생하는 미세먼지가 면역반응과 염증반응 시 과량으로 생성되는 것으로 알려진 NO_2^- 와 NO_2^- 를 생성하는 iNOS

protein의 발현 및 NO에 의하여 2차적으로 형성되는 nitrotyrosinated-protein의 유발에 미치는 영향을 배양된 흰쥐의 폐포대식세포에서 측정하여 PM의 흡입이 건강한 사람에서와 기존 폐 질환이 있는 환자들에게 어떠한 영향을 미칠 수 있는지를 간접적으로 분석하고자 하였다.

SPF 흰쥐에서 분리된 폐포대식세포에 PM만을 농도별(5-20 μ g/cm²)로 투여하였을 때 모든 투여군에서 NO_2^- 가 검출되었으나, 투여농도의 증가에 비례하여 NO_2^- 형성이 항상 통계적으로 유의하게 증가하지는 않았다. PM과 LPS(5ng/ml)를 병용으로 투여한 처치군에서는 LPS에 의한 NO_2^- 형성 효과를 더욱 증가시키는 상승효과가 10-20 μ g/cm²의 투여농도에서 관찰되었으나, 그 보다 낮은 농도에서는 관찰되지 않았다. PM과 LPS를 병용투여한 후 배양시간의 증가(12-48시간)가 NO_2^- 형성에 미치는 효과를 측정한 실험에서는 모든 처치군에서 세포배양 시간의 연장에 비례하여 NO_2^- 형성이 증가되었다. 본 실험의 결과들에서 가장 특징적인 것 중의 하나는 미세분진 자체가 SPF 흰쥐의 폐포대식세포에서 NO_2^- 형성을 유발하였다는 점이다. 본 실험과 유사한 조건에서 실시되었던 이전의 연구들에서는 흡입가능한 입자성물질(예: 석면과 DEP) 그 자체는 폐포대식세포에서 NO형성을 유발하는 효과가 없는 것으로 밝혀졌었다¹⁶. 이러한 연구결과의 차이점은 본 실험에 사용된 PM이 중금속을 비롯한 아주 다양한 생물학적 및 화학적 성분들을 함유하고 있기 때문인 것으로 추정된다. 대도시의 대기 중에 부유하는 비슷한 종류의 미세먼지라 하더라도 미세먼지의 화학적인 구성과 물리적인 특성에 따라 생물학적인 효과는 다르게 나타날 수 있음을 암시한다고 할 수 있다. 한편, PM이 LPS의 NO형성 효과를 상승적으로 높이는 현상은 유사한 종류의 미세입자인 DEP나 석면을 이용한 이전의 연구들에서도 확인되었다¹⁷. 이는 세균의 세포막 성분인 LPS에 의하여 활성이 유도된 폐포대식세포는 NO를 형성하는 효과에 있어서 유사한 종류의 다른 흡입성 입자들에 대하여도 유사하게 반응하는 것으로 해석된다.

NO_2^- 측정을 위한 실험조건과 동일하게 처리되어 배양된 실험군에서 분리된 단백질과 Lab-Tek[®] cha-

mber에서 배양된 세포들에 대하여 실시한 iNOS western blot analysis와 면역염색의 결과도 단백질의 발현 수준에 있어서 NO_2^- 생성결과와 상관성이 있는 것으로 확인되었다. 이는 본 실험에서 측정된 NO_2^- 는 이미 세포에 발현되어 있었던 iNOS protein의 단순한 활성도의 증가에 의한 것이 아니라, 실험적 처치에 의한 자극이 세포내부에 전달되어 새로운 iNOS의 발현을 증가시켰고, NO_2^- 형성은 이에 따른 결과로 풀이된다. 본 실험의 결과에서 또 다른 하나의 특징은 자연적으로 유발된 폐내 염증성 증상이 있는 흰쥐에서 분리된 폐포대식세포에서 PM의 투여농도에 비례하여 NO_2^- 가 생성되었다는 점이다. 이러한 효과는 본 연구의 SPF 흰쥐에서 분리된 폐포대식세포에서는 나타나지 않았으며, 이전의 어느 연구자도 이와 같은 결과를 보고한 바 없었다. 또한, 이러한 결과는 기관지 천식이나 폐렴 증상이 있는 사람이 대도시의 미세분진을 흡입할 경우 폐 내에서 NO 형성이 증가할 수 있고, 질병의 악화나 기타 증상 변화에 영향을 미칠 수 있음을 암시한다고 할 수 있다.

Nitrotyrosinated-proteins의 형성은 대조군을 포함한 모든 투여군에서 검출되었으나, PM과 LPS의 단독투여군 및 LPS와 PM을 병용 투여한 처치 군에서 양성반응을 보인 세포의 수가 통계학적으로 유의하게 증가하였다. 이는 각 처치에 따른 NO_2^- 형성에 의한 실험적인 결과로 해석된다. 한편, NO_2^- 를 형성할 가능성이 전혀 없는 대조군에서 일부의 세포들이 nitrotyrosin antibody에 대하여 양성 반응을 보인 것은 본 실험에서의 처리효과로 보이지 않는다. Tyrosine의 hydroxyl(OH)기에 ONOO^- 이 결합하는 반응은 비가역반응으로 알려져 있는 바, 본 실험에서 아무것도 처치하지 않은 대조군에서 nitrotyrosinated-proteins이 검출된 것은 본 실험의 대조군으로 이용된 실험동물의 체내에서 이미 자연적인 어떤 원인들에 의하여 형성되었던 것으로 판단된다.

결론적으로, 위의 실험결과들은 본 연구자가 근무하는 대학의 대로변 지역에서 발생되어 공기 중에 부유하는 미세먼지를 건강한 사람이 일정한 농도 이상으로 흡입할 경우에는 염증성반응 시 하나의 중요한 세포활성인자로 작용하는 NO형성에 영향을 미칠 수

있을 것으로 추정되며, 천식이나 염증성 폐질환이 있는 사람이 흡입할 경우에는 NO형성을 더욱 증가시켜 질환의 증상을 악화시킬 가능성이 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 본 연구는 교통량이 많은 서울의 한 대로변에서 채취된 복합적인 미세분진이 염증반응이 일어날 때 형성되는 것으로 알려진 NO와 NO를 형성하는 iNOS발현 및 NO에 의하여 생성이 증가되는 nitro-tyrosinated-protein의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SPF 흰쥐와 염증성 흰쥐에서 분리된 폐포대식세포와 그람음성 세균의 세포벽 성분인 LPS에 감작시켜 분석하였다.

방 법: SPF 흰쥐와 염증성 흰쥐의 폐포대식세포에서 PM을 농도별로 처리하였을 때와 동일한 농도에서 배양시간을 달리하였을 때 분비되는 NO를 Griess reaction 방법으로 측정하였고, iNOS와 nitrotyrosinated-protein의 발현을 세포면역화학염색법과 western blot 분석법으로 확인하였다.

결 과: PM의 단독투여 및 LPS와 PM을 혼합하여 투여하였을 때 NO의 생성 및 iNOS와 nitrotyrosinated-protein의 발현을 확인할 수 있었고, 그 효과는 LPS를 단독투여 하였을 때보다 발현이 증가함을 확인할 수 있었다. 한편, 폐 내 자연적 염증성 증상이 있는 흰쥐에서 분리된 폐 내 대식세포는 PM의 농도 증가에 따라 비례하여 NO의 형성을 증가시켰다.

결 론: 본 실험에 사용된 PM은 그 자체만으로도 SPF 흰쥐와 폐렴증상이 있는 흰쥐 BAL cell에서 NO의 생성을 증가시켰고, LPS가 처리된 세포들에 PM을 병용하여 투여하였을 경우에는 NO의 생성과 iNOS와 nitrotyrosinated-protein의 발현이 유의하게 상승되었다.

참 고 문 헌

1. Salma I, Willy M, Eva ZP, Gyula A. Comprehensive characterisation of atmospheric aerosols in Budapest,

- Hungary: physicochemical properties of inorganic species. *Atmos Environ* 2001;35:4367-78.
2. Schwartz J, Dockery DW, Neas LM. Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air Waste Manag Assoc* 1996;46:927-39.
3. Hung YC, Guh JH, Cheng ZJ, Chang YL, Hwang TL, Liao CH, et al. Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives: involvement of I κ B- α stabilization. *Eur J Pharmacol* 2001;418: 133-9.
4. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999; 20:1945-52.
5. Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or independent mechanisms. *Cancer Res* 1994;54:2462-7.
6. Zhang X, Alley EW, Russell SW, Morrison DC. Necessity and sufficiency of beta interferon for nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1994;62: 33-40.
7. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Balish E. Nitric oxide production does not directly increase macrophage candidacidal activity. *Infect Immun* 1995;63: 1142-4.
8. Morin AM, Stanboli A. Nitric oxide synthase localization in cultured cerebrovascular endothelium during mitosis. *Exp Cell Res* 1994;211:183-8.
9. Adams LB, Franzblau SG, Vavrin Z, Hibbsand JB Jr, Krahenbuhl JL. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol* 1991;147:1642-6.
10. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987;79:319-26.
11. Salvemini D, Radziszewski W, Korbut R, Vane J. The use of oxyhaemoglobin to explore the events underlying inhibition of platelet aggregation induced by NO or NO-donors. *Br J Pharmacol* 1990;101:991-5.
12. Zhang J, Megaridis CM. Soot suppression by ferrocene in laminar ethylene/air nonpremixed flames. *Combust Flame* 1996;105:528-40.
13. Harrison RM, Yin J. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci Total Environ* 2000;249: 85-101.
14. Ito T, Ikeda M, Yamasaki H, Sagai M, Tomita T. Peroxynitrite formation by diesel exhaust particles in alveolar cells: links to pulmonary inflammation. *Environ Toxicol Pharmacol* 2000;9:1-8.
15. Pandya RJ, Solomon G, Kinner A, Balmes JR. Diesel exhaust and asthma: hypotheses and molecular mechanisms of action. *Environ Health Perspect* 2002;110(Suppl 1):103-12.
16. Dong CC, Yin XJ, Ma JX, Millecchia L, Wu ZX, Barger MW, et al. Effects of diesel exhaust particles on allergic reactions and airway responsiveness in ovalbumin-sensitized brown Norway rats. *Toxicol Sci* 2005;88:202-12.
17. Choe N, Tanaka S, Kagan E. Asbestos fibers and interleukin-1 upregulate the formation of reactive nitrogen species in rat pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19:226-36.