

# 미세분진이 흰쥐의 폐포대식세포에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 형성에 미치는 효과

<sup>1</sup>건국대학교 수의과대학, <sup>2</sup>경북대학교 수의과대학, <sup>3</sup>국립수의과학검역원

리천주<sup>1</sup>, 이수진<sup>1</sup>, 박세종<sup>1</sup>, 장병준<sup>1</sup>, 이종환<sup>1</sup>, 김길수<sup>2</sup>, 이명현<sup>3</sup>, 최농훈<sup>1</sup>

## The Effects of Air-borne Particulate Matters on the Alveolar Macrophages for the TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ Secretion

Tian Zhu Li<sup>1</sup>, Soo-Jin Lee<sup>1</sup>, Se-Jong Park<sup>1</sup>, Byung-Joon Chang<sup>1</sup>, Jong-Hwan Lee<sup>1</sup>, Kil-Soo Kim<sup>2</sup>, Myoung-Heon Lee<sup>3</sup>, Nong-Hoon Choe<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Konkuk University College of Veterinary Medicine, Seoul. <sup>2</sup>Kyungpook National University College of Veterinary Medicine,

<sup>3</sup>National Veterinary Research and Quarantine Service.

**Background:** PM is known to induce various pulmonary diseases, including asthma, cancer, fibrosis and chronic bronchitis. Despite the epidemiological evidence the pathogenesis of PM-related pulmonary diseases is unclear.

**Methods:** This study examined the effects of PM exposure on the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the cultured alveolar macrophages. The cultured primary alveolar macrophages were treated with the medium, PM (5~20 $\mu$ g/cm<sup>3</sup>), LPS (5ng/ml), and PM with LPS for 24h and 48h respectively. ELISA was used to assay the secreted TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the culture medium. Western blotting was used to identify and determine the level of proteins isolated from the culture cells. The cells cultured in the Lab-Tek<sup>®</sup> chamber slides were stained with immunocytochemical stains.

**Results:** PM induced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  secretion in the culturing alveolar macrophages, collected from the SPF and inflammatory rats. However, the effects were only dose-dependent in the inflammatory macrophages. When the cells were co-treated with PM and LPS, there was a significant synergistic effect compared with the LPS in the both cell types.

**Conclusion:** PM might be play an important role in the induction and/or potentiation of various lung diseases by oversecretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . (*Tuberc Respir Dis* 2006; 60: 554-563)

**Key words :** Particulate matter (PM), Alveolar macrophages, Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).

## 서 론

최근의 연구들에 따르면 전 세계적으로 환경오염이 증가하고 있는 추세이다<sup>1-3</sup>. 특히 대도시의 대기오염은 점차 악화되어 시민의 건강을 위협하고 있으며, 더불어 심·폐 질환의 발병률과 사망률도 증가하고 있다.<sup>4-6</sup> 심·폐 질환을 야기하는 대기오염물질로는 이산화질소, 오존, 미세분진 등이 있는데, 특히 미세분진의 흡입은 비염이나 천식과 같은 알레르기성 질환<sup>2,3</sup> 및 염증성 폐질환 모두를 악화시킨다고 알려져 있다<sup>6,7</sup>.

입자상 물질 가운데 총부유먼지(total suspended

particles; TSP)는 환경기준의 설정과 환경오염의 지표로 널리 이용되고 있다.

TSP중 크기가 10 $\mu$ m 이상인 입자는 입과 코의 점막에서 여과된다. 그러나 10 $\mu$ m이하인 호흡성 먼지는 호흡기관 깊숙이 들어가 기관지와 폐포에 침착되어 폐의 정상적인 공기유통을 교란시킨다. 폐포에 침착된 미세분진은 복잡한 여러 경로를 통하여 기존의 만성적인 폐질환을 악화시키기도 하며, 새로운 염증성 질환이나 암 등을 유발한다고 알려져 있다<sup>3,8,9</sup>.

호흡을 통하여 외부로부터 이물질이 폐 내로 들어왔을 때, 폐포대식세포가 외부물질을 제거하는 일차적 역할을 한다<sup>10</sup>. 미세분진(particulate matter; PM)에 대한 폐포대식세포의 다양한 작용은 명확하게 알려진 바가 없으나, 다만 PM의 물리·화학적 특성에 따라 그 효과는 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다.

TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )는 활성화된 대식세포에 의하여 주로 생성되며, 세균감염이나 악성종양 발생 시 숙주의 반응에 있어서 중요한 역할을

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01-2002-00571-0) 지원으로 수행되었음

Address for correspondence: Nong-Hoon Choe, PhD.

Konkuk University College of Veterinary Medicine 1

Hwa-yang dong, Gwang-jin gu, Seoul, Korea

Phone: 02-450-3709 Fax: 02-450-3037

E-mail: nojamaji@hanmail.net

Received : Dec. 13. 2005

Accepted : May. 2. 2006

한다<sup>11,12</sup>. TNF- $\alpha$ 는 보통 IL-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ )와 함께 작용하며 감염이나 종양이 있을 때 나타나는 면역 반응에서 inflammatory cytokine으로 작용한다. 또한 염증반응에 있어서 TNF- $\alpha$ 는 혈액과 조직사이의 구조물인 내피세포를 자극하여 ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), ALCAM-1 (activated leukocyte cell adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)과 같은 부착분자(adhesion molecule)들의 생산을 촉진하여 각종의 백혈구들을 염증부위로 이동시키는 역할도 한다<sup>13,14</sup>. 이러한 기전들을 통하여 염증부위에 축적된 백혈구는 각종 cytokine을 지속적으로 분비하여 미생물과 종양세포에 대한 독성을 유지하기도 하며<sup>15</sup>, 한편으로 염증반응을 유발시켜 조직을 손상시키기도 한다<sup>16</sup>.

LPS (lipopolysaccharide)는 그람음성 세균의 세포벽 성분으로서 macro-phage를 강력하게 활성화시켜 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma)를 포함한 여러 cytokine을 유리시켜 종양의 용혈성괴사 및 항암작용을 발휘하는 것으로 알려져 있다<sup>17</sup>.

따라서 본 연구에서는 미세먼지(PM)가 폐포대식세포의 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성에 직접적으로 영향을 주는지 실험해 보았다. 그리고 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  생성을 자극하는 또 다른 물질인 LPS에 PM을 투여했을 때 어떠한 영향을 미치는지를 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 실험동물

SPF Sprague-Dawley계 흰쥐(300g, ♂) 40마리를 (주)샘타코에서 구입하였고, (주)중앙실험동물에서 제조한 사료를 물과 함께 자유급식 시키는 상태에서 실험동물전용 사육실에서 사육하였다.

### 실험시약 구입

ELISA reader기는 미국 Molecular Devices사에서 구입한 VERSA max<sup>TM</sup>를 사용하였다. 전기영동은 미국 Biorad사에서 구입한 기기를 사용하였고, TNF-

$\alpha$  및 IL-1 $\beta$  antibody 그리고 Rat TNF- $\alpha$  및 Rat IL-1 $\beta$  ELISA kit는 미국 Biosource사에서 구입하였다. LPS (E.Coli serotype O55 B5), RPMI-1640 medium, 세포면역화학염색법의 발색을 위한 3, 3'-diamino benzidine(DAB) 등의 일반 시약은 모두 Sigma사 제품을 사용하였다.

### PM의 수집

PM시료 (total precipitated particles)는 서울시 광진구 화양동의 전철 2호선 건대입구역으로부터 구의역 사이의 도로변 주위 건축물(창틀, 공중전화박스, 교통신호등제어기 등)에 쌓여있는 것을 수시로 채취하였다. PM의 대표성을 위하여 30곳 이상의 장소에서 균일한 양을 채취하였고, 미세한 모래입자 등의 오염방지를 위하여 지상 1.2m 이상의 높이에 자연적으로 낙하된 미세먼지만을 선별적으로 모았다. 채취된 분진은 균일하게 혼합한 후 가열 및 건조시켜 수분과 기타 오염 가능한 물질을 완전히 제거하였다. PM의 성분검사는 수의과학검역원(특수독성부)에 의뢰하여

Table 1. Conditions of microwave digestion system

Instrument	Digestion stage	
	Stage 1	Stage 2
Running time(min)	10	15
Magnetic power(W)	1000	1000
Initial pressure(PSI)	0	200
Finish pressure(PSI)	200	200
Initial temperature(℃)	22	180
Finish temperature(℃)	180	180

Table 2. Analysis conditions of PM

Instrument	Conditions
Forward power(W)	1200
Nebulizer gas flow( $\ell$ /min)	0.6
View height(mm)	9.0
Plasma gas flow( $\ell$ /min)	10
Pump speed(RPM)	10

중금속 성분의 함유량을 중심으로 분석하였다. 채취된 PM은  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였고, 실험에 필요한 경우 소량씩 꺼내어 녹인 후 30초간 3번씩 초음파분쇄기로 분쇄하였다(in 0.05% DMSO). 최종적으로 10% FBS가 포함된 RPMI-1640 cell culture medium에 희석하여 배양된 세포에 사용하였다.

### PM의 화학적 성분의 검사

PM 시료는 Modified EPA method 3052로 전처리하였고 전처리장비는 초고압초음파분쇄장치 (Micro-wave Digestion System; MDS, Questron Co., USA), 분해용매는  $\text{HNO}_3$  과 HF mixture sol(3:1 v/v)을 사용하였다. 분해조건은 다음과 같다(Table 1).

분석기기로는 Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Labtab Co., Australia)를 사용하여 아래의 조건으로 Al, Fe, Cu 등을 분석하였다(Table 2).

### Alveolar Macrophage의 분리

Ketamin과 Xylazine (Rumpun<sup>®</sup>) 1:5 혼합용액을 흰쥐의 복강내로 주사하였다(0.5 ml/200g B.W.). 흰쥐가 완전히 마취된 후 고정판에 양와자세로 고정한다. 70% 알콜로 흰쥐의 복·흉부 피부를 소독하고 복부를 절개하여 배대동맥을 노출시키고 10ml의 일회용 주사기(21G needle)를 사용하여 배대동맥을 통하여 완전히 사혈하였다. 이어서 경부기도를 1/2가량 절개하고 18-gauge cannula를 넣고 기관지 폐포세척술 (bronchoalveolar lavage, BAL; with  $37^{\circ}\text{C}$   $\text{Ca}^{2+}$  &  $\text{Mg}^{2+}$  free PBS, 6ml  $\times$  5회)을 시행하여 폐포대식세포를 채취하였다. 채취한 폐포대식세포를 원심분리 (600rpm  $\times$  5min)하여 회수하였다. 폐포세척술로 얻어진 폐포세척액은 Cytospin<sup>®</sup> 기계를 사용하여 세포를 슬라이드에 부착시킨 후 Diff-Quik<sup>®</sup> 염색을 실시하였다. 여기서 염증성 세포가 발견되는 시료는 ELISA를 하여 별도의 실험에 사용하였고 주 실험에는 이용되지 않았다. 분리된 폐포대식세포는 RPMI- 1640 medium (10% FBS)을 사용하여 12wells plate (0.5 $\times$ 106/well/

ml)에 loading한 후 2시간 동안 전배양 ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  with 95% air)을 실시하였다. 전배양을 마친 세포들에서 상층액을 제거한 후 실험설계에 따라 준비된 처리용액을 투여하였다.

### PM의 노출농도 및 노출시간의 선정

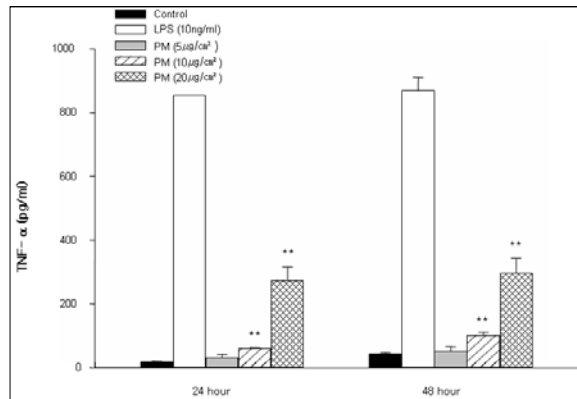
반복된 기초실험(PM의 농도 10~50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 폐포대식세포의 배양 6~72h)을 통하여 가장 이상적인 실험 조건으로 PM의 노출농도는 5~20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 범위에서, 세포의 배양시간은 24~48시간으로 정하였다.

### ELISA 기법을 이용한 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 측정

BAL (bronchoalveolar lavage)를 실시 후 Diff-Quik<sup>®</sup> 염색을 실시하여 염증성 소견이 없는 폐포대식세포를 12 wells tissue culture plate에 seeding (0.5  $\times$  10<sup>5</sup>/well/ml)하고, 2시간 동안 전배양( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  with 95% air)을 실시하였다. 전배양을 마친 세포들은 상층액을 제거한 후 실험설계에 따라 준비된 처리용액을 투여하고, 각각 정해진 시간동안 세포배양을 실시하였다. 세포배양 후 상층액을 분리하여 즉시  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였고, 각 시료 에서 ELISA 기법으로 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성을 정량적으로 측정하였다. 구체적인 실험방법은 ELISA plate 제조사에서 제공한 실험방법을 따랐으며, 대략적인 절차는 아래와 같았다. 50 $\mu\text{l}$ 의 standard dileunt buffer를 zero well에 넣고, 50 $\mu\text{l}$ 의 농도 별 표준용액과 시료용액을 각 well에 넣은 다음 anti-TNF- $\alpha$  (biotin conjugate) 및 anti-IL-1 $\beta$  (biotin conjugate) 용액 50 $\mu\text{l}$ 를 각 well에 넣어 혼합하고 상온에서 1시간 30분 반응시켰다. 상층액을 제거한 후 수세 buffer로 3회 세척하였다. 그 후 streptavidin-HRP working solution 100 $\mu\text{l}$ 를 각 well에 넣고 45분간 상온에서 반응시켰다. 수세 buffer로 다시 3 회 세척하고, 100 $\mu\text{l}$ 의 발색제를 각 well에 넣은 후 어두운 곳에서 30분간 반응시켰다. 최종적으로 100 $\mu\text{l}$ 의 stop solution을 각 well에 넣고, microplate reader기에서(450nm) 발색도를 측정하여 정량화 하였다.

Table 3. PM analysis

분석원소	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mg	Mn	Pb	Zn
분석결과 (ppm)	5411.0	4.6	미검출	9.5	31.4	126.5	2064.0	2.0	1152.0	311.4	135.7	785.3



**Figure 1.** Treatment-response relation for TNF- $\alpha$  secretion in the cultured inflammatory BAL cells. Cells were cultured with medium only, LPS (10ng/ml) only and various concentrations of PM (5~20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) for 24 hours and 48 hours.

\*\*P<0.01 versus control. Mean  $\pm$  SEM of four independent experiments per category.

### TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 단백질의 세포면역화학염색법

각 처치에 따른 폐포대식세포에서 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 발현정도를 세포 면역화학염색법을 통하여 확인하기 위하여 순수 분리된 세포들을 Lab-Tek<sup>®</sup> chamber slides (0.3 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/well/ml)에서 배양하였다. 실험을 위한 각 chamber는 세포배양기내에서 6시간 배양하였고, 세포배양 후 chamber내의 상층 액은 버리고 즉시 10% 포르말린용액에 세포가 부착된 슬라이드를 담가 5분간 고정하여 건조시켰고, 세포면역화학염색 실험시까지 냉장 보관하였다. 대략적인 면역염색의 절차는 아래와 같다. 고정시킨 chamber 슬라이드를 TBS에 5분간 수세하고, endogenous peroxidase activity를 억제하기 위하여 3%의 과산화수소 용액에 15분간 처리하였다. 그 후 1%의 BSA (bovine serum albumin)에 30분간 담가 항체의 비특이반응을 방지하였고, TNF- $\alpha$  antibody (10 $\mu$ g/ml)와 IL-1 $\beta$  antibody (10 $\mu$ g/ml)를 별도의 시료에 각각 2시

간동안 상온에서 처리하였다. 2차 항체는 DAKO LSBA<sup>®</sup> 2 kit anti-rabbit Ig를 30분간 처리하고, DAKO LSBA<sup>®</sup> 2 kit HRP에서 30분간 처리한 후 DAB를 사용하여 발색시켰다. 슬라이드를 완전히 건조시킨 후 Harris's hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 각 군의 항체의 발현정도는 임의로 선정된 세 곳에서 각각 100개의 세포를 세었을 때 발색되는 세포수를 백분율로 나타내었다.

### TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 검출을 위한 western blot analysis

폐포대식세포를 6 well culture plates에 1.5 $\times$ 10<sup>7</sup>/well의 수로 loading 하고, RPMI-1640 medium (with 10% FBS)으로 세포배양기내에서 2시간 전배양 하였다. 24시간 동안 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 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM DTT, 50 $\mu$ g/ml PMSF)를 투여하고 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 보관하였다. 그 후 세포추출 용액을 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 단백질을 분리하였고, Bradford methods를 이용하여 정량하였다. 분리된 단백질은 15% SDS-PAGE gel을 사용하여 전기영동을 실시하였고, nitrocellulose transfer membrane으로 옮긴 후 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 5% skim milk로 blocking을 실시하였다. 1차항체로는 anti-TNF- $\alpha$  및 anti-IL-1 $\beta$  antibody를 nitrocellulose transfer membrane에 처리하였고, 10분씩 3번 수세 buffer로 세척하였다. horseradish peroxidase와 2차항체가 결합된 용액으로 처리하여 ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 단백질의 band를 확인하였다.

### 통계처리

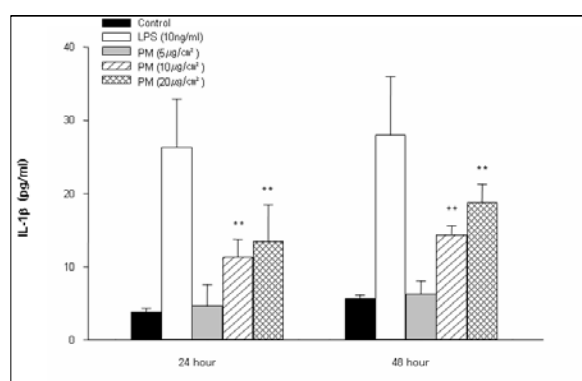
통계 프로그램인 SPSS 10.0을 사용하여 실험설계

에 대한 분산분석은 ANOVA로, 각 처치 군들과의 비교는 student t-test를 실시하여 검정하였다. 각 자료는 4번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과를 Mean  $\pm$  SEM로 표시하였고,  $p < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

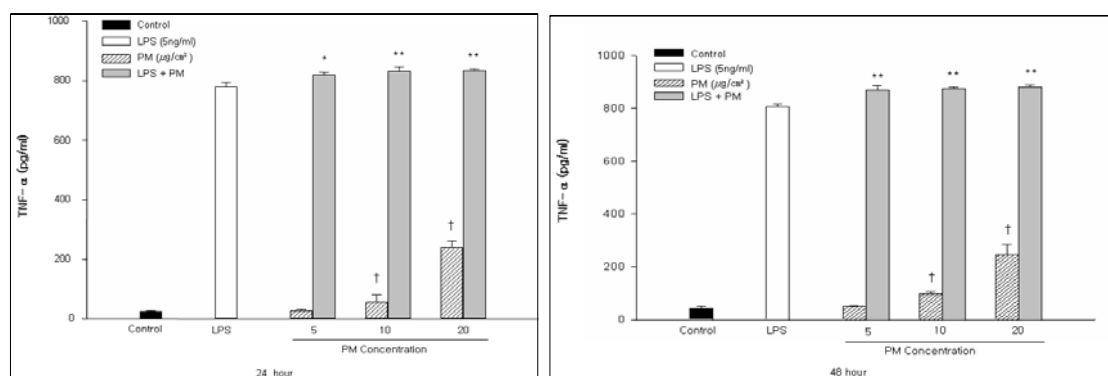
### PM 성분분석 결과

PM 성분분석 결과는 Table 3에 표시하였다.



**Figure 2.** Treatment-response relation for IL-1 $\beta$  secretion in the cultured inflammatory BAL cells. Cells were cultured with medium only, LPS (10ng/ml) only and various concentrations of PM (5~20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) for 24 hours and 48 hours.

\*\*P<0.01 versus control. Mean  $\pm$  SEM of four independent experiments per category.



**Figure 3.** Treatment-response relation for TNF- $\alpha$  secretion in the cultured SPF rat alveolar macrophages at 24 hours and 48 hours. Cells were cultured with medium only (sham control), LPS (5ng/ml), various concentrations of PM (5, 10, 20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) and various concentrations of PM with LPS.

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

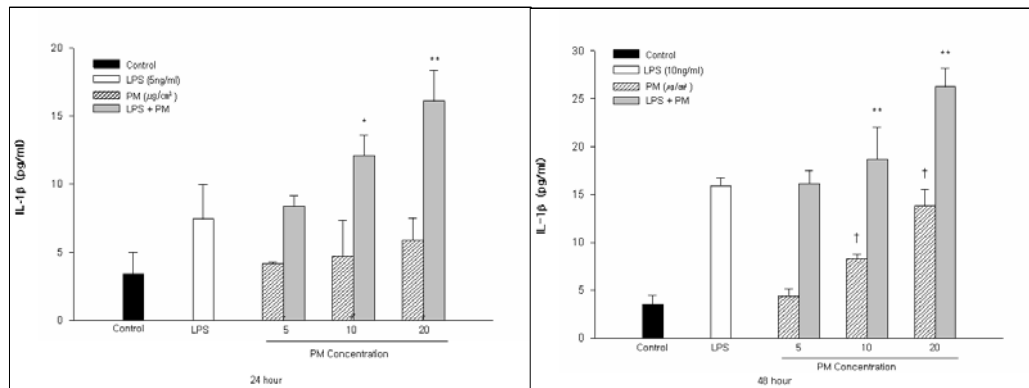
### ELISA 기법을 이용한 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 형성 측정

폐렴증상이 있는 흰쥐에서 분리된 폐포대식세포에 PM을 단독으로 투여한(5~20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) 후 각각 24시간 및 48시간 동안 세포를 배양하고, 배양된 배지에서 TNF- $\alpha$ 를 측정된 결과 모든 처치군에서 TNF- $\alpha$ 의 생성이 확인되었다. 투여된 미세먼진의 농도(5~20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)가 증가할수록 TNF- $\alpha$ 의 생성도 확연히 증가되었다. 그러나 세포 배양 시간에 비례한 증가는 유의하지 않았다(Fig. 1). 같은 시료들에서 생성된 IL-1 $\beta$ 의 농도를 측정된 결과 IL-1 $\beta$ 의 생성 역시 투여된 미세먼진의 농도의 증가에 따라서는 유의하게 증가하였지만, 시간의 증가에 대해서는 그렇지 않았다(Fig. 2).

PM 단독투여(5~20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)한 SPF 흰쥐에서 생성된 TNF- $\alpha$ 를 측정된 결과 모든 처치군에서 TNF- $\alpha$ 의 생성이 확인되었고, 투여용량의 증가에 따른 TNF- $\alpha$  생성도가 유의하게 증가하였다.

LPS와 PM을 병용하여 투여하였을 때에는 모든 처치군에서 LPS를 단독으로 투여하였을 때보다 유의하게 증가하였으나, 투여용량의 증가에 따른 효과는 없었다(Fig. 3). 세포 배양 시간(24h, 48h)을 달리한 실험의 결과는 서로 유사한 경향을 보였으나, 이 역시 시간에 비례하지 않았다(Fig. 3).

SPF 흰쥐에서 분리한 세포들에 PM을 단독으로 투여(5~20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)한 후 IL-1 $\beta$ 를 측정된 결과 모든 처치



**Figure 4.** Treatment-response relation for IL-1 $\beta$  secretion in the cultured SPF rat's alveolar macrophages at 24 hours and 48 hours. Cells were cultured with medium only (sham control), LPS (5ng/ml), various concentrations of PM (5, 10, 20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) and various concentrations of PM with LPS.

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

**Table 4.** Proportion(%) of positive cells to TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in cultured alveolar macrophages after treatment with medium only, LPS (5ng/ml) only, PM (20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) only and PM with LPS at 6 hours.

	Control	LPS	PM	LPS+PM
TNF- $\alpha$	0.3 $\pm$ 0.6	34.0 $\pm$ 2.7	5.7 $\pm$ 2.1	70.0 $\pm$ 2.0** †
IL-1 $\beta$	3.0 $\pm$ 1.0	55.7 $\pm$ 2.4	5.7 $\pm$ 1.5	85.3 $\pm$ 2.2** †

\*\*P<0.01 versus control.

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

군에서 생성이 확인되었으나, PM 투여농도의 증가에 따른 상승효과는 통계학적으로 유의하지 않았다. LPS와 PM을 병용하여 투여하였을 때에는 LPS 단독 투여에 비해 PM 고농도의 처리군(10~20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)에서 만 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 세포를 48시간 배양 하고 측정한 실험에서는 24시간에서의 결과와 유사한 경향을 보였다.

#### TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 세포면역화학염색법

Lab-Tek<sup>®</sup> chamber 슬라이드에서 배양된 폐포대 식세포에 각 처치에 따른 세포배양 후 세포면역화학 염색을 실시하였고, 그 결과를 Fig. 5 및 Fig. 6과 Table 4에 각각 나타내었다. 광학현미경하에서 TNF- $\alpha$ 의 발현정도를 관찰한 결과 대조군 Fig. 5-(a)에서는 관찰할 수 없었지만, LPS를 처리한 양성대조 군 Fig. 5-(b)와 PM 처리군 Fig. 5-(c) 및 LPS와 PM 병합처리군 Fig. 5-(d)에서는 TNF- $\alpha$ 의 발현을 관

찰할 수 있었다. Fig. 5-(e) 및 Fig. 5-(f)는 각각 LPS 처리군과 LPS와 PM 병용처리군의  $\times$ 1,000 확대사진 이다. 각 처치군에 따른 TNF- $\alpha$ 의 발현은 PM과 LPS를 각각 단독으로 처리한 처치군에서도 TNF- $\alpha$  단백질의 발현이 확인되었고, LPS와 PM을 함께 처리한 실험군에서는 TNF- $\alpha$ 의 발현율이 가장 높아 LPS를 단독으로 처리한 실험군보다 높은 양성반응을 보였다. 각 처치군에 따른 IL-1 $\beta$ 의 발현정도는 Fig. 6과 같았다. 음성대조군 Fig. 6-(a)에서는 TNF- $\alpha$  발현을 관찰할 수 없었고, PM Fig. 6-(c) 및 LPS단독 처리군 Fig. 6-(b)과 LPS와 PM을 혼합 처리한 처치군 Fig. 6-(d)에서는 발현의 정도가 각각 증가되었음을 확인할 수 있었다. Fig. 6-(e) 및 Fig. 6-(f)는 각각 LPS 처리군과 LPS와 PM 병용처리군의  $\times$ 1,000 확대사진이다.

각 시료에서의 발현정도를 백분율(%)로 환산한 결과는 Table 4에 나타내었다. Table 4는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 발현정도를 세포면역화학염색법으로 실시

하고, 각 군의 항체의 발현정도를 광학현미경 ( $\times 400$ )에서 임의 3곳을 선정하여 연속적으로 100개의 세포를 세었을 때 발색되는 세포의 수를 백분율로 표시한 것이다(Mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ).

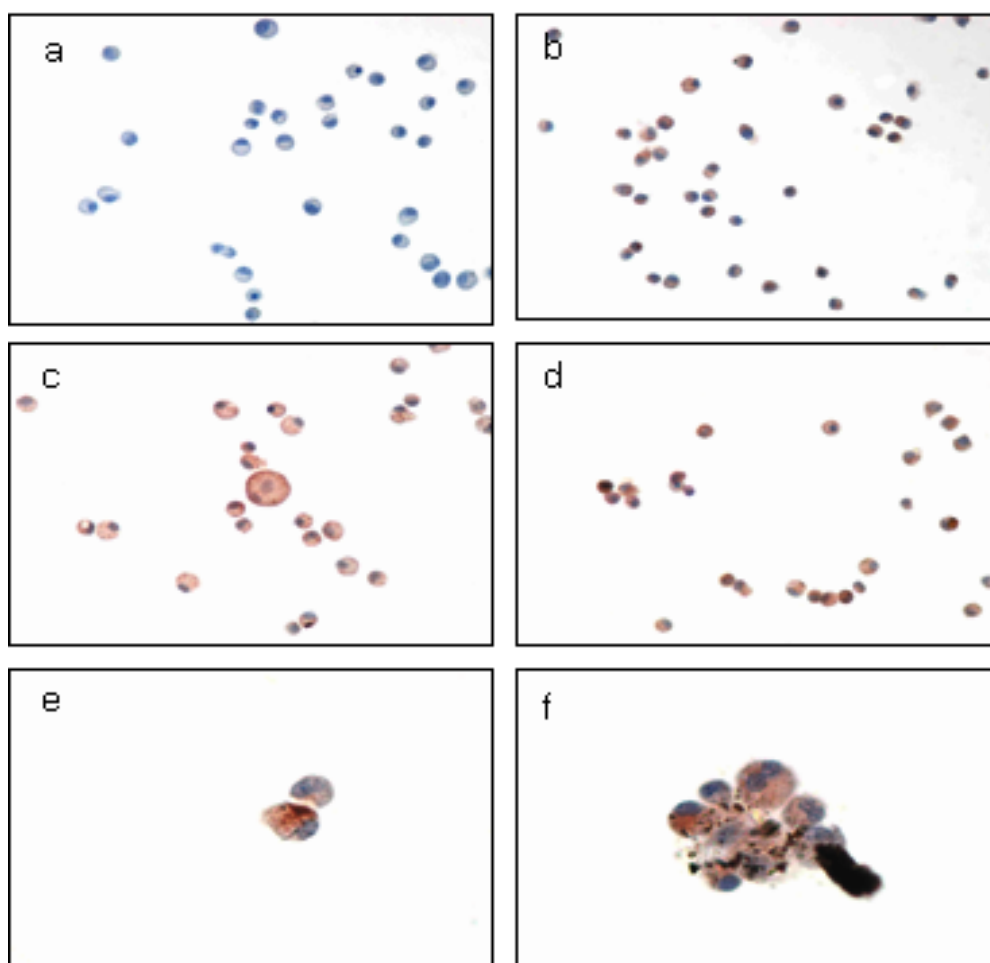
### TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ western blot analysis

면역염색을 통한 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 발현정도를 단백질의 양적인 수준에서 검증하기 위하여 western blot을 실시하였다. 그 결과 대조군의 시료에서는 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 가 거의 검출되지 않았고, PM을 단독으로 투여한 처치군에서는 미약하게 발현되었으며, LPS 및 LPS와 PM이 함께 처치된 투여군에서는 아

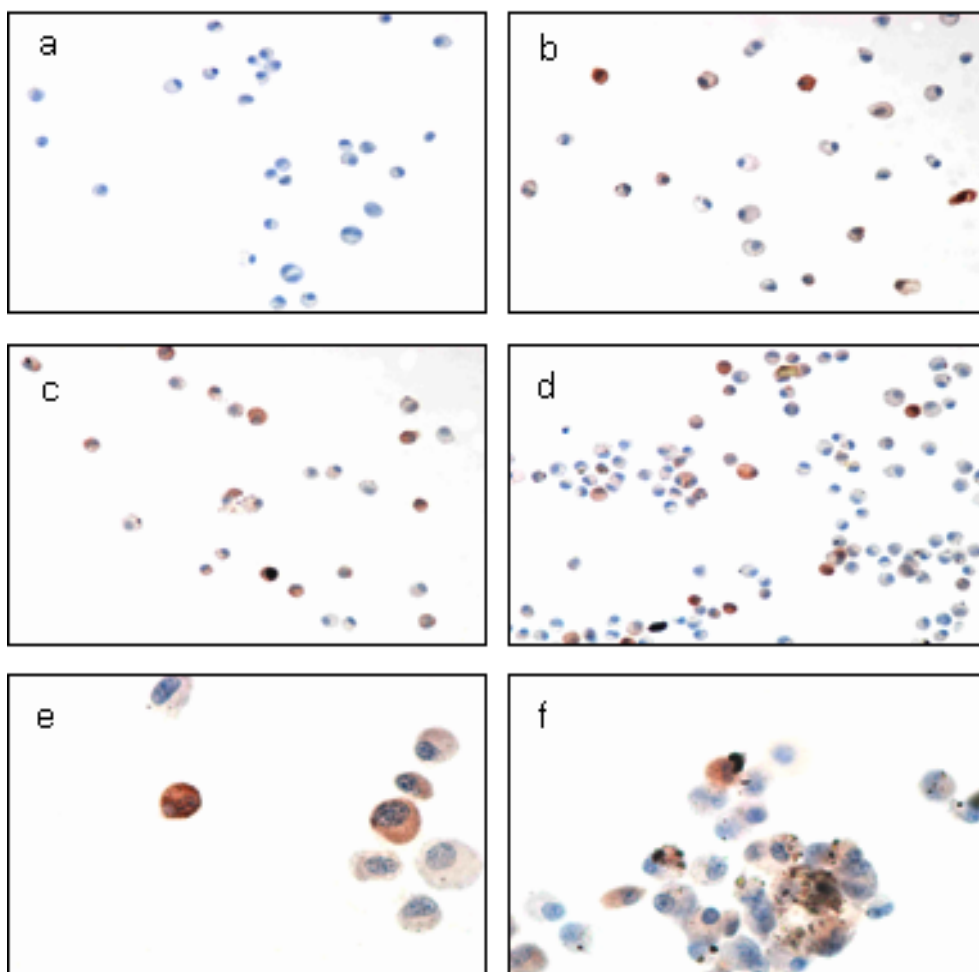
주 강하게 발현되었다(Fig. 7). 이러한 결과는 면역염색 ELISA의 결과와도 유사한 것이다.

### 고 찰

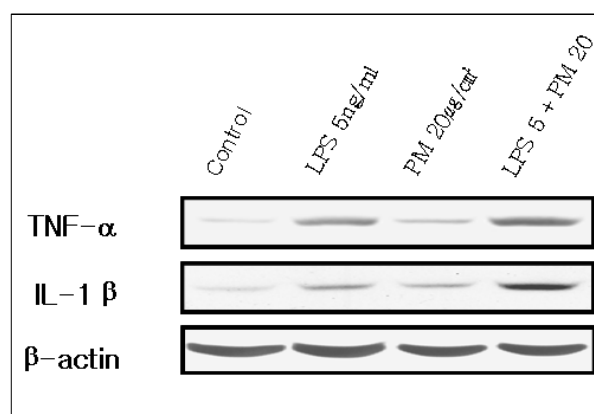
국내에서는 오래전부터 몇몇 연구진들에 의하여 주로 산업성 유해물질인 석면, 인조섬유, DEP(diesel exhaust particles) 및 silica 등에 의한 호흡기의 유해성에 관한 연구가 추진되어 왔었다<sup>18-21</sup>. 그러나 국내 대도시의 도로가에서 형성된 PM을 채취하여 화학적 성분을 조사하고, PM이 실험동물의 호흡기에 미치는 영향-폐질환 유발, 각종 염증인자 발현을 규명하는 연구는 현재까지 실시되지 않았다.



**Figure 5.** Immunocytochemical stains for TNF- $\alpha$  in the cultured rat alveolar macrophages ( $\times 400$ ). Cells were cultured with (a) medium only, (b) LPS (5ng/ml) only, (c) PM (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) only, and (d) LPS with PM at 6h. (e) LPS only ( $\times 1,000$ ) and (f) LPS with PM ( $\times 1,000$ ) at same incubation time.



**Figure 6.** Immunocytochemical stains for IL-1 $\beta$  in the cultured rat alveolar macrophages ( $\times 400$ ). Cells were cultured with (a) medium only, (b) LPS (5ng/ml) only, (c) PM (20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) only, and (d) LPS with PM at 6h. (e) LPS only ( $\times 1,000$ ) and (f) LPS with PM( $\times 1,000$ ) at same incubation time.



**Figure 7.** Western blot for TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the cultured rat alveolar macrophages. Cells were cultured with medium only, LPS only, PM only and PM with LPS for 6 hours. The level of  $\beta$ -actin was similar in all of the tested samples.

본 실험에 사용된 PM의 화학적구성에 관하여 12 종류의 중금속을 중심으로 분석한 결과 카드뮴을 제외한 11종의 주요 중금속이 검출되었으며, 특히 알루미늄, 철, 아연의 비중의 높게 차지하고 있는 것으로 나타났다(Table 3).

PM에 의한 폐내 염증반응에서 중요한 활성인자로서 연구가 활발하게 이루어진 것이 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 이다<sup>20,22</sup>. 본 연구진은 PM의 흡입이 기존의 염증성 폐질환에 미치는 영향을 간접적으로 알아보기 위하여 배양된 일차 폐포대식세포(SPF 동물에서 분리)에 LPS를 전처리(감작)한 후 PM을 농도 및 세포배양시간별로 노출시키고, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 형성에 미치는 효과를 측정하였다. 또한 PM의 흡입이 기존의 염



증성 폐질환에 미치는 영향을 보다 실증적으로 알아보기 위하여 폐렴증상이 있는 것으로 확인된 흰쥐들에서 폐 내의 세포들을 분리한 후 위와 동일한 실험을 실시하였다.

실험결과 SPF 흰쥐에서 분리한 폐포대식세포에 PM을 단독으로 처리한 결과 모든 투여군에서 투여용량의 증가에 비례하여 TNF- $\alpha$ (5~200pg/ml)의 형성이 확인되었다. IL-1 $\beta$ 의 경우 모든 투여군에서 형성이 증가하였으나 아주 낮은 농도로 (<15pg/ml) 형성되었다. 그러나 두 인자 모두 배양시간의 증가에 따른 생성효과는 확인되지 않았다. PM과 LPS를 병용하여 투여하였을 때에는 TNF- $\alpha$ 의 경우 LPS 단독투여에 의한 효과에 상승적으로 유의하게 증가하였으나 PM의 투여용량 증가에 따른 효과는 확인되지 않았다. IL-1b의 경우에는 고농도에서만 LPS와 PM 병용투여에 따른 상승적 생성효과가 확인되었다. 염증이 있는 것으로 판별된 흰쥐에서 분리된 폐포대식세포에서는 PM 노출 농도의 증가에 따른 TNF- $\alpha$ 의 생성효과가 뚜렷하게 증가하여 대조군에 비하여 최고 2,000%이상 높게 형성되었다. IL-1 $\beta$ 의 경우에는 대조군에 비하여 최고 300%이상 높게 생성되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과들은 염증성 질환이 없는 건강한 사람이 PM을 흡입할 경우에는 PM이 폐포내 대식세포의 활성화에 미치는 영향이 낮게 나타날 수 있으나, 염증성 폐질환이나 기타 호흡기 질환이 있는 사람이 흡입할 경우에는 TNF- $\alpha$ 나 IL-1 $\beta$ 와 같은 세포활성인자의 형성에 아주 커다란 영향을 미쳐 질환의 병인에 영향을 미치는 것으로 풀이할 수 있겠다.

## 요 약

연구 배경: 대도시의 대기오염은 점차 악화되어 시민의 건강을 위협하고, 심·폐 질환의 발병률과 이로 인한 사망률을 증가시키고 있다. 서울시 도로가의 PM이 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성에 직접적으로 어떠한 영향을 미치는지와 PM의 노출이 LPS의 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성효과에는 어떠한 영향을 미치는지를 평가하고자 하였다.

방 법: 폐렴이 있는 흰쥐와 SPF 흰쥐의 폐포대식

세포 각각에 PM을 농도별로 처리하여 분리되는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 농도를 측정하였다. 측정 방법으로는 western blot, ELISA 및 세포면역화학염색법을 이용하였다. 또한 동일 PM 농도에서 배양시간을 달리하여 위와 같이 측정하였다.

결 과: SPF인 흰쥐에서 분리된 폐포대식세포에 PM을 단독으로 투여하였을 때 대조군에 비해서 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성도가 모든 투여군에서 유의하게 증가하였으나, 투여용량의 증가에 따른 유의성은 없었다. 그러나 염증성인 쥐에서 분리된 폐포대식세포에서는 모든 투여군에서 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였으며, PM 투여농도의 증가에 따른 생성량도 유의하게 증가하였다.

결 론: PM을 장기간 혹은 일정 농도 이상으로 흡입할 경우 폐포대식세포의 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 분비에 영향을 미쳐 새로운 폐질환을 유발할 수 있다. 그러므로 기존에 염증성 폐질환이나 기관지천식이 있는 환자가 미세먼지를 흡입할 경우에는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성에 커다란 영향을 미쳐 호흡기 질환을 더욱 악화시킬 가능성이 있을 것으로 추정된다.

## 참 고 문 헌

1. Harre ES, Price PD, Ayrey RB, Toop LJ, Martin IR, Town GI. Respiratory effects of air pollution in chronic obstructive pulmonary disease: a three-month prospective study. *Thorax* 1997;52:1040-4.
2. Lebowitz MD. Epidemiological studies of the respiratory effects of air pollution. *Eur Respir J* 1996;9:1029-54.
3. Pope CA 3rd, Dockery DW, Spengler JD, Raizenne ME. Respiratory health and PM10 pollution: a daily time series analysis. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:668-74.
4. Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society. Health effects of outdoor air pollution: part 2. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:477-98.
5. Dockery DW, Pope CA 3rd. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health* 1994;15:107-32.
6. Pope CA 3rd, Kanner RE. Acute effects of PM10 pollution on pulmonary function of smokers with mild to moderate COPD. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:

- 1336-40.
7. Emanuel MB. Hay fever, a post industrial revolution epidemic: a history of its growth during the 19th century. *Clin Allergy* 1988;18:295-304.
8. Abbey DE, Hwang BL, Burchette RJ, Vancuren T, Mills PK. Estimated long-term ambient concentrations of PM10 and development of respiratory symptoms in a nonsmoking population. *Arch Environ Health* 1995;50:139-52.
9. Dusseldorp A, Kruize H, Brunekreef B, Hofschreuder P, de Meer G, van Oudvorst AB. Associations of PM10 and airborne iron with respiratory health of adults living near a steel factory. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1932-9.
10. Fels AO, Cohn ZA. The alveolar macrophage. *J Appl Physiol* 1986;60:353-69.
11. Tracey KJ, Cerami A. Metabolic responses to cachectin/TNF. *Ann N Y Acad Sci* 1990;587:325-31.
12. Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med* 1993;21:S423-35.
13. Briscoe DM, Cotran RS, Pober JS. Effect of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo: correlation with CD3+T cell infiltration. *J Immunol* 1992;149:2954-60.
14. Gamber JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:8667-71.
15. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy of immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 1993;119:1198-208.
16. Tracy KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, lee AT, Kuo GC, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987;330:662-4.
17. Manel DN, Moore RN, Mergenhagen SE. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor necrotizing factor). *Infect Immun* 1980;30:523-30.
18. Kim KA, Lee DW, Lim Y, Yun IG. Effect of asbestos on fibroblast proliferation of rat. *Korean J Occup Environ Med* 1996;8:392-402.
19. Lim Y, Kim KA, Kim HN, Lee DW, Cho WS, Yun IG. Cytotoxicity and apoptosis by silica, asbestos and man-made mineral fibers. *Korean J Occup Environ Med* 1997;9:641-9.
20. Lim Y, Kim KA, Yun IG. The measurement of IL-1, 8, TNF for the diagnosis of pneumoconiosis. *Korean J Occup Environ Med* 1997;9:17-25.
21. Lim Y, Kim SH, Cho YJ, Kim KA, Oh MW, Lee KH. Silica-induced oxygen radical generation in alveolar macrophage. *Ind Health* 1997;35:380-7.
22. Vanhee D, Gosset P, Marquette CH, Wallaert B, Lafitte JJ, Gosselin B, et al. Secretion and mRNA expression of TNF alpha and IL-6 in the lungs of pneumoconiosis patients. *Am J Respir Crit Med* 1995;152:298-306.