

PM2.5로 자극한 폐상피세포의 NF κ B 활성화에 NO의 역할

가톨릭대학교 성모병원 산업의학과, 쿠마모토대학 약리학교실

김경아, 남혜윤, 문제혁, 정진숙, 임 영, Kai H*

= Abstract =

Role of NO in Activation of NF κ B by PM2.5 in Lung Epithelial Cells

**Kim Kyoung Ah, Nam Hae Yun, Mun Je Hyeok,
Jeong Jin Sook, Lim Young, Kai Hirofumi**

*Department of Occupational & Environmental Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea
Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

Background : The present study was performed to further improve our understanding of the molecular mechanisms involved in the activation of NF κ B, a major transcriptional factor involved in the inflammatory response in the lung, by particulate matter in lung epithelial cells with an aerodynamic diameter of less than 2.5 μ m (PM2.5).

Methods : Immediate production of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS), with the PM2.5 induced expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), I κ B degradation and NF κ B-dependent transcriptional activity, in A549 cells, were monitored. Addition, we also examined the effect of the iNOS inhibitor, L-N⁶-(1-iminoethyl) lysine hydrochloride (L-NIL), on the PM2.5-induced NF κ B activation in A549 cells.

Results : The rapid degradation of I κ B and the increase of transcriptional activity of the NF κ B-dependent promoter were observed in A549 cells exposed to PM2.5. The immediate production of ROS in response to PM2.5 in A549 cells was not clearly detected, although immediate responses were observed in RAW264.7 cells. A549 cells, cultured in the presence of PM2.5, produced an increase in NO, which was noticeably significant after 15 min of exposure with the expression of iNOS mRNA. The addition of L-NIL, an iNOS inhibitor, signifi-

¹본 연구는 한국과학재단의 2000 해외 Post-doc 연수지원에 의하여 수행되었음

Address for correspondence :

Young Lim

Department of Occupational and Environmental Medicine, St. Mary's Hospital,
The Catholic University of Korea, 62 Yoido-dong, Youngdunpo-gu, Seoul 150-713, Korea
Phone : 02-3779-1401 Fax : 02-782-6017 E-mail : nglim@catholic.ac.kr

cantly inhibited the PM2.5-induced IκB degradation and the increase of the NFκB-dependent transcriptional activity.

Conclusion : These results suggest that PM2.5 stimulates the immediate production of RNS, leading to the activation of NFκB in the pulmonary epithelium. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2002, 52 : 616-626)

Key words : PM2.5, NFκB, ROS, RNS.

서 론

대기오염물질 중 입자형 오염물질(particulate matter, PM)과 호흡기 질환과의 관련성은 이미 여러 역학적인 연구를 통하여 알려져 있으며¹⁻³ 최근에는 특히 분진의 직경이 2.5 μm 이하의 미세분진(PM2.5)이 대기오염에 의한 호흡기 건강장해의 주요 원인물질로 알려지고 있다⁴⁻⁶.

역학적 연구결과에 근거하여 PM2.5에 의한 호흡기질환의 발현 및 악화기전을 밝히고자 많은 연구들이 진행되고 있으나 아직까지 명확하게 알려지지 않고 있다. 뿐만 아니라, PM2.5에 의한 호흡기의 생물학적 반응을 연구함에 있어, 다량의 PM2.5의 포집이 어려운 관계로 도심지역 PM2.5의 주요 구성성분인 diesel exhaust particle (DEP)을 PM2.5 대신에 사용하고 있다⁷⁻⁹. DEP를 이용한 연구결과로서 PM2.5에 의한 생체반응을 추정하고는 있으나, PM2.5는 DEP 이외에 다양한 발생원이 있으며 지역에 따라 그 구성성분, 활성화도 등에 차이가 있음으로¹⁰ 국내에서 포집한 PM2.5를 이용한 연구가 필요할 것이다.

DEP에 의한 호흡기질환의 발현 및 악화기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나 DEP에 의하여 염증을 유발하는 매개물질의 유전자가 발현증가하고 그로 인한 염증반응증가가 원인으로 지적되고 있다. 최근에는 DEP에 의해 비정상적으로 발현이 증가되는 IL-8, GM-CSF, IL-6¹¹⁻¹³와 같은 염증성 유전자를 조절하는 역할을 하는 전사인자의 활성화 기전에 관심이 집중되고 있는데 특히 염증조절에 중요한 기능을 하는 것으로 알려진 NFκB가 DEP에 의하여 활

성화 됨은 이미 알려져 있다^{14,15}. NFκB는 반응성 산소기(Reactive oxygen species, ROS)에 의하여 활성화 됨으로¹⁶ PM2.5에 의하여 생산 증가된 ROS에 의하여 NFκB 활성화 될 것이라는 것이 일반적인 의견이다¹⁷.

Nitric oxide (NO) 및 관련된 질소기들(Reactive nitrogen species, RNS)과 NFκB의 신호전달과정은 밀접하게 연관되어 있다. 그러나 NFκB 활성화 과정에 있어 RNS의 역할은 자극과 세포의 종류에 따라 다양하게 나타난다. 사람의 임파구나 쥐의 폐상피세포에서는 RNS가 NFκB를 활성화시키는 반면 간세포나 혈관내피세포에서는 억제한다¹⁸. 하지만 PM2.5와 관련된 NFκB 활성화 과정에 대한 RNS의 역할은 아직 연구되어진 바 없다.

폐상피세포는 외부 자극에 대한 1차 방어벽의 역할을 하며 여러 가지 매개물질의 분비하는 기능도 가지고 있어¹⁹ 분진에 의한 폐의 염증 및 그와 관련된 반응 연구에 있어 중요한 목표세포로 이용되어 왔다. 폐장의 중요 탐식세포인 대식세포²⁰나 비탐식세포인 섬유모세포²¹ 조차도 분진의 자극에 대하여 즉각적인 ROS의 분비가 관찰되나 폐상피세포에서는 자극에 의한 일련의 반응들이 즉각적인 ROS의 분비증가 없이 이루어 진다는 보고들이 발표되고 있다. 그러므로 PM2.5자극에 의한 폐상피세포의 NFκB 활성화는 ROS 이외의 다른 경로를 통하여 이루어질 가능성이 있다.

따라서 본연구에서는 우리나라 서울지역에서 채취된 PM2.5를 이용하여 폐상피세포를 자극하였을 때의 NFκB 활성화 과정에서 RNS의 역할에 대하여 알아 보고자 시도되었다.

재료 및 방법

PM2.5의 채취 및 분리

대한민국 서울지역에서 1999년 10월부터 6개월에 걸쳐 high volume sampler를 통해 quartz filter 위에 PM2.5를 포집하였다. 포집 24시간 이내 filter는 멸균한 물에 담그었다가 초음파 처리하여 filter에서 분진을 떨어뜨린 후 건조시켜 사용하였다. PM2.5의 무게를 잰 후 배지를 이용하여 1 mg/ml 농도의 분진懸탁액을 만들어 사용하였다.

세포배양과 분진 및 억제처리

폐상피세포 세포주인 A549 (ATCC CCL 185, Rockvill, MD) 세포와 단핵세포 세포주인 RAW264.7 (ATCC TIB71, Rockvill, MD)이 이용되었다. iNOS 억제제인 L-N⁶-(1-iminoethyl) lysine hydrochloride(L-NIL)은 분진처리 1시간 전에 전처리 하였다.

ROS의 측정

세포의 종류에 따른 PM2.5에 의한 ROS 생산의 차이를 알아보기 위하여 A549 세포 뿐 아니라 분진자극에 의하여 즉각적인 ROS의 분비가 증명된 단핵세포 세포주인 RAW264.7 세포도 같이 이용되었다. ROS의 생성은 luminol을 이용하여 ROS와의 반응에 의한 light emission을 측정함으로써 정량하였다. HEPES-Hanks buffer에 세포수가 4×10^6 개/ μ l 가 되게 하여 측정용 96-well white plate에 30 μ l 씩 분주하였다. 1 mM의 luminol 용액을 20 μ l 씩 가하고 37°C로 맞추어진 microplate luminometer (MicroLumaPlus, Berthold Co., Wildbad, Germany)에 넣고 5분간 정지상태로 두었다. 분진 또는 양성대조군인 PMA (20 μ M) 넣어 총 부피를 100 μ l 로 맞추어 MicroLumaPlus에 다시 넣고 60분간

light emission을 측정하였다. 이때 측정 간격은 30 초, 측정시간은 1초로 지정하였고 측정단위는 relative light unit/sec로 표시하였다. 즉각적인 ROS의 분비가 없을 것으로 예상되는 A549 세포 실험시는 다른 양성대조군으로서 ROS의 하나인 H₂O₂를 첨가하여 비교하였다.

RNS의 측정

세포로부터 NO 생산의 지표로서 배양 상층액내 nitrite 농도를 측정하였다. 5×10^5 개/well이 되도록 24 well plate에 분주하고 배양하여 well에 90% 정도 차기를 기다렸다가 혈청이 포함되지 않은 배지로 갈아주고 다시 배양하였다. 18시간 후 세포를 배지로 세척한 후 PM2.5가 포함된 배지로 갈아주었다. 대조군은 분진이 포함되지 않은 배지로 갈아주었다. 분진으로 자극하고 지정된 시간동안 배양한 후 배양 상층액을 거두어 10,000 rpm으로 원심분리하여 분진을 제거하고 즉시 상층액내 nitrite 농도를 측정하였다. 상층액 100 μ l 에 Griess reagent (sulfanilamide 1%, naphthylethylenediamine 0.1%, phosphoric acid 2.5%) 100 μ l 를 넣고 10분간 실온에서 반응시킨 후 540 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 NaNO₂를 사용하여 구하였다.

RT-PCR

PM2.5 자극에 의한 A549 세포의 inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA 발현 변화는 RT-PCR을 이용하여 관찰하였다. 지름 6 cm 배양접시에 A549 세포가 90% 찼을 때 PM2.5를 처리하고 1시간 후 TRIzol reagent (GIBCO BRL)를 이용하여 RNA를 추출한 후 정량하였다. RNA PCR Kit (AMV) Ver 2.1 (Takara biomedical, Japan)을 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 추출된 RNA 0.5 μ g을 이용하여 cDNA (42°C 60분, 95°C 5분, 5°C

5분)를 합성하였으며 이때 primer는 oligo dT-primer를 이용하였다. PCR에 사용된 primer는 iNOS의 경우 upstream primer로서 5'-GAG ATA GAA ACA ACA GGA ACC TAC C-3'와 downstream primer로는 5'-GTC CAT GAT GGT CAC ATT CTG CTT-3'가 사용되었고 GAPDH의 upstream primer는 5'-GGA GCA TGT GAA TGC CAT CCA G-3'가 그리고 downstream primer로 5'-GGA TGA CAA GCA GAA AGT CCT TC-3'가 사용되었다. 합성된 cDNA 반응액에 각각의 primer를 넣고 94°C 1분, 64°C 1분, 72°C 1.5분의 조건에서 25-40 회 반응 시켰으며 25, 30, 35, 그리고 40회의 반응이 끝났을 때 각각의 반응액을 덜어 2% agarose gel 상에 전기영동하였으며, 이동한 DNA 밴드의 위치를 ethidium bromide 염색으로 확인하였다.

I κ B Western blot

6 cm 배양접시에 A549 세포를 동일수로 분주한 후 세포가 배양접시에 90% 정도 찻을 때 혈청이 포함되지 않은 배지로 바꾸어주고 18시간 동안 이산화탄소 배양기에 배양하였다. 18시간 후 분진이 함유된 배지로 갈아주고 일정시간동안 배양한 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하였다. 배양접시에 단백질 용해용액 300 μ l 를 넣고 4°C에 10분동안 놓아두었다. 용해된 세포용액을 1.5 ml tube에 옮겨 10,000 rpm에서 5분동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 여기에 3배 sample 용액 100 μ l 를 추가하고, 단백질은 Bio-Rad protein assay kit 를 이용하여 정량하였다. 단백질을 15% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 전기영동한 단백질을 transfer시킨 nitrocellulose membrane을 일차항체인 anti-I κ B α rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1:1000 용액에 담그어 실온에서 3시간 반응시키고 3번 세척한 후 anti-rabbit IgG-HRP

(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)을 TTBS에 1:2000로 희석시킨 용액에 45분간 반응시켰다. TTBS로 10분씩 3번 세척한 후 ECL detection kit (Amersham, Arlington Heights, IL)로 확인하였다.

Transient transfection 및 NF κ B-dependent transcriptional activity 측정

A549세포를 24 well plate에 well 당 4×10^4 씩 분주하고 배양판 면적의 40-70% 차기를 기다렸다가 NF κ B-luc reporter plasmid를 Transfectam (Promega, Madison, WI)를 이용하여 세포로 transfection시켰다. 이때 NF κ B-luc gene은 promoter 부위에 NF κ B 부착부위가 4회 반복되어 있는 것을 이용하였다. internal standard로서 Renilla luciferase를 발현하고 있는 pRL-CMV vector를 같이 transfection 하여 transfection 효율의 차이에 따른 firefly luciferase reporter gene의 발현 차이를 보정하였다. transfection하고 약 2시간 후 10% FBS가 포함된 배지로 바꾸어주고 36시간 더 배양하였으며 그 후 혈청이 함유되지 않은 배지로 갈아서 12시간 더 배양한 후 분진 및 약제 처리하였다. 6시간 경과 후 dual-luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI)와 MicroLumaPlus를 이용하여 luciferase activity를 측정하였다. Relative luciferase activity는 renilla activity로 보정한 후 분진 처리하지 않은 대조군에 대한 비율로서 표시하였다.

통계학적 검정

모든 실험은 8배수로 준비하여 실시하였다. 실험적은 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 실험군이 하나 이면서 대조군과 비교시는 student t-test로 그리고 분진농도에 따른 변화를 검정할 때에는 Anova와 multiple comparison 방법을 이용하여 분석하였다.

결 과

PM2.5에 의한 NF κ B 활성화

PM2.5에 의한 NF κ B 활성화는 두 가지 방법으로 확인하였다. NF κ B과 결합하여 세포질에서 핵내로 이동을 막는 역할을 하는 I κ B α 의 분해를 western blot 방법으로 측정하여 NF κ B의 활성화 정도를 간접적으로 측정하였으며 NF κ B-dependent 발현을 보이는 reporter vector의 활성도를 통하여 관찰하였다. PM2.5 처리하고 30분 후부터 I κ B α 의 분해가 시작되었으며 2시간째 최대로 분해되었고 그 후는 회복되었다(Fig. 1A). 처리한 PM2.5의 농도를 달리하였을 때 PM2.5의 농도가 증가할수록 I κ B α 의 분해정도가 더 커지는 양-반응 관계를 보였다(Fig. 1B). NF κ B-dependent transcriptional activity는 PM2.5의 농도가 증가할수록 증가하는 양-반응 관계를 보여 PM2.5가 NF κ B를 활성화시킴을 알 수 있었다(Fig. 2).

PM2.5로 자극한 폐상피세포의 ROS와 RNS 분비

A549 세포를 PM2.5나 양성대조군인 PMA 로 자극

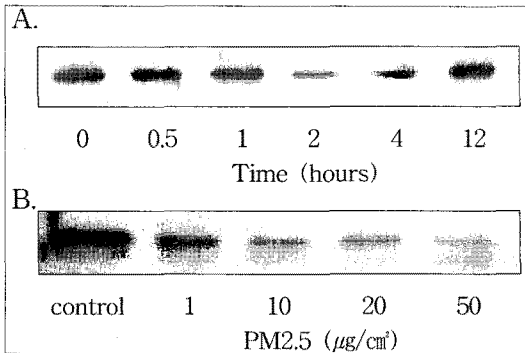


Fig. 1. PM2.5 induces I κ B α degradation in A549 cells. A. PM2.5 induces I κ B α degradation in a time-dependent manner. Cells were exposed to PM2.5 (50 μ g/cm²) for time periods ranging from 30 min to 12h. B. PM2.5 induces I κ B α degradation in a dose-dependent manner. Cells were exposed to PM2.5 (1-50 μ g/cm²) for 2 h.

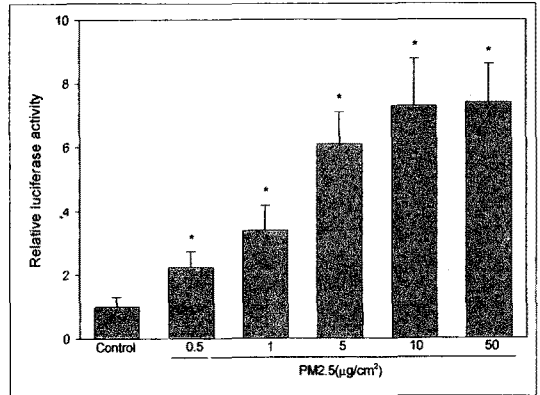


Fig. 2. Activation of an NF κ B-dependent luciferase reporter vector in A549 cells exposed to PM2.5. A549 cells were transiently transfected with NF κ B-dependent luciferase reporter vector in the presence of pRL-CMV. Cells were incubated with PM2.5 for 6 h and harvested for determination of luciferase and renilla activities. The luciferase activities are normalized to renilla. The data shows fold increases compared with the untreated controls.

하고 1시간까지 관찰하였을 때 명확한 ROS의 분비는 관찰되지 않았다(Fig. 3B, C, Fig. 4). 그러나 RAW264.7세포를 PM2.5나 양성대조군이 PMA로 자극시는 2분에서 4분 사이에 peak를 보이는 ROS의 생산증가가 관찰되었다(Fig. 3E, F). RNS분비의 지표로서 측정된 nitrite는 분진을 첨가하고 15분 후에도 유의한 분비증가를 보였으며 자극한 PM2.5의 농도가 증가할수록 분비되는 nitrite도 증가하는 양-반응 관계를 보였다(Fig. 5).

PM2.5에 의한 iNOS mRNA 발현

폐상피세포의 NO 분비는 NOS 중 iNOS에 의한다는 것은 이미 알려져 있다. PM2.5에 의하여 NO를 발생시키는 iNOS의 mRNA 발현이 증가하는지 RT-PCR 방법으로 확인하였는바 Fig 6에서 보는 바와 같이 PM2.5의 농도가 증가할수록 iNOS mRNA 발현이 증가하여 PM2.5 자극에 의하여 A549세포의

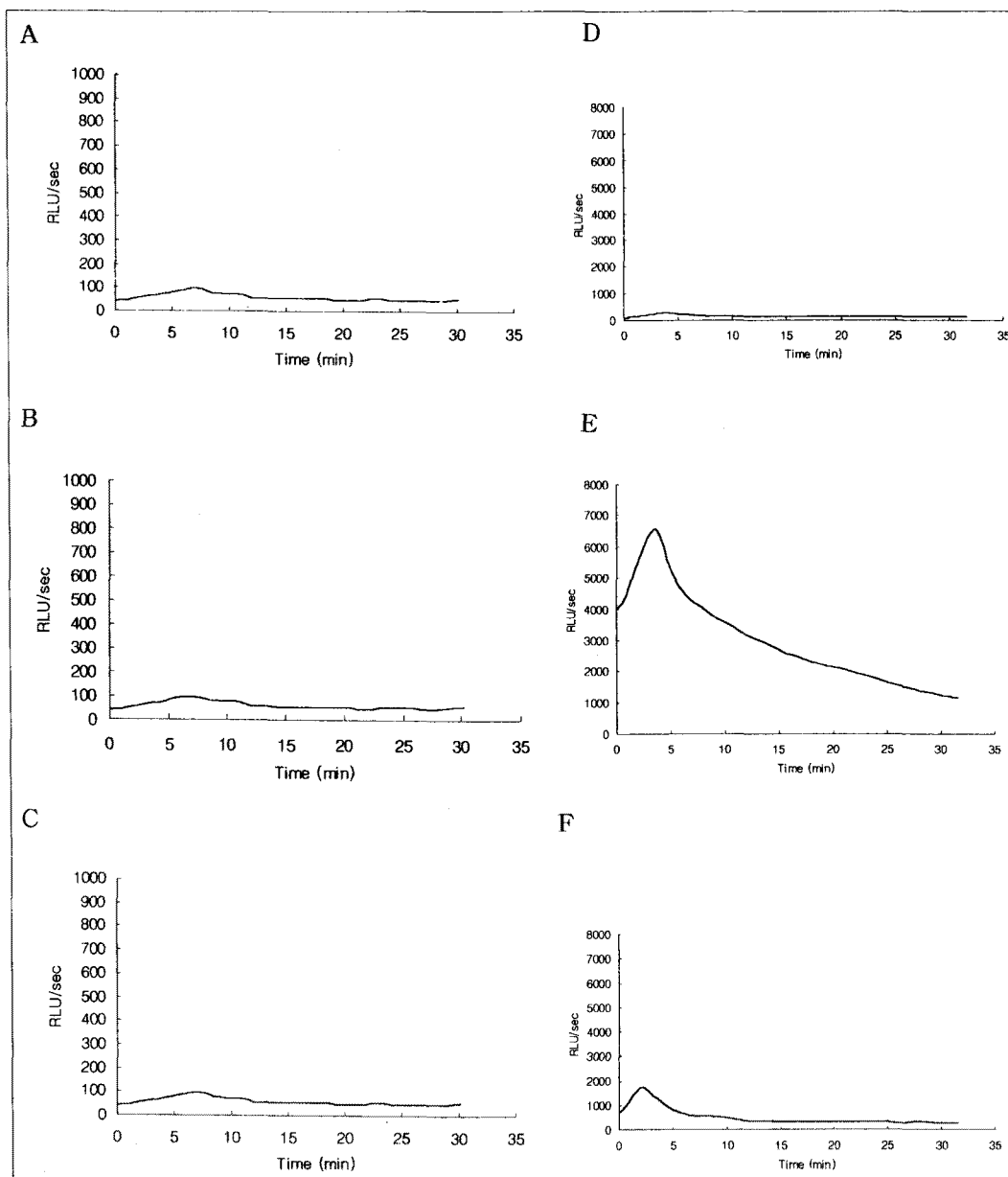


Fig. 3. time-series plot of the chemiluminescence of cells.

A : Chemiluminescence of A549 cells without stimulants.

B : Chemiluminescence of A549 cells stimulated with PMA

C : Chemiluminescence of A549 cells stimulated with PM2.5 (500 μ g/ μ l)

D : Chemiluminescence of RAW264.7 cells without stimulants.

E : Chemiluminescence of RAW264.7 cells stimulated with PMA

F : Chemiluminescence of RAW264.7 cells stimulated with PM2.5 (500 μ g/ μ l)

RLU : relative light unit

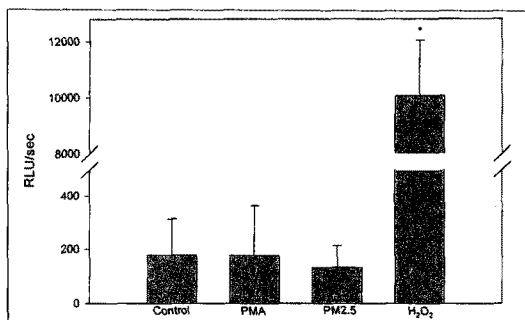
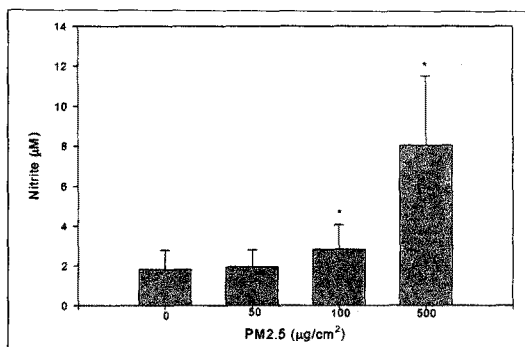
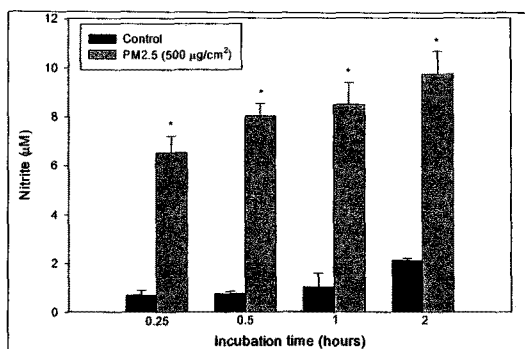


Fig. 4. The effects of PM2.5 and H₂O₂ on chemiluminescence of A549 cells.

RLU : relative light unit. *P<0.05 versus control



A



B

Fig. 5. Nitrite concentration in the culture supernatant of A549 cells exposed to PM2.5. A. The dose-response effect of PM2.5 on nitrite release from A549 cells. B. Nitrite release from A549 cells exposed to PM2.5 (500 µg/cm²) for time periods ranging from 15 min to 120 min. * P < 0.05 versus control.

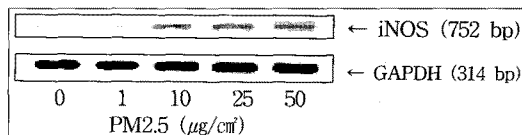


Fig. 6. The effect of PM2.5 on iNOS mRNA levels, as measured by RT-PCR of human lung epithelial cells (A549), after 1 h of treatment at concentrations ranging from 1 to 50 µg/cm².

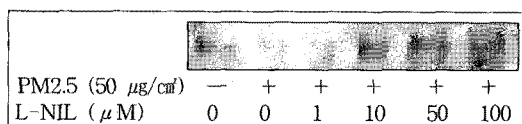


Fig. 7. The effect of L-NIL on IκBα degradation in A549 cells exposed to PM2.5. Cells were exposed to PM2.5 (50 µg/cm²) for 2h, and lysates were prepared for Western blotting of IκBα. Twenty µg of cytoplasmic protein was applied per lane.

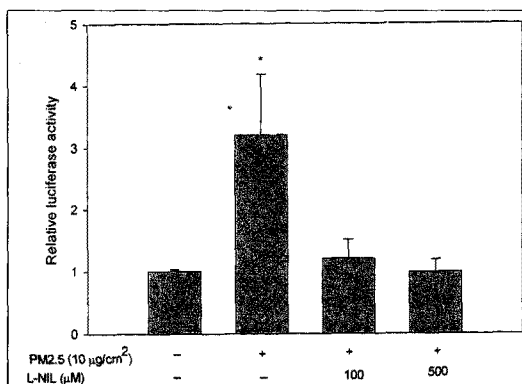


Fig. 8. The effect of L-NIL on the activation of NFκB luciferase in A549 cells exposed to PM2.5. A549 cells were transiently transfected with the NFκB-dependent luciferase reporter vector in the presence of pRL-CMV, and exposed to PM2.5 for 6h. Cells were pre-incubated with L-NIL for 1h before the addition of the dust. Luciferase activities are normalized to those of renilla. The data shows fold increases compared with the untreated controls.

*P < 0.05 versus PM2.5(-), L-NIL(-)

iNOS mRNA 발현이 즉각적으로 일어난다는 것을 알 수 있었다.

L-NIL이 PM2.5에 의한 폐상피세포내 NF κ B의 활성화에 미치는 영향

PM2.5를 세포에 가하기 전 iNOS 억제제인 L-NIL로 전처리 하였을 때 I κ B α 의 분해가 억제되었으며 (Fig. 7), NF κ B-dependent transcriptional activity도 감소하여 (Fig. 8) 폐상피세포에서 PM2.5에 의한 NF κ B 활성화 과정에 RNS가 중요한 작용을 함을 알 수 있었다.

고 찰

대기오염물질 중 PM에 의한 호흡기계 건강피해는 지난 10년간의 역학적인 연구를 통하여 증명되어졌다. 특히 직경이 2.5 μ m 이하인 PM을 일컫는 PM2.5는 대기오염에 의한 호흡기 건강장해의 주요 원인물질로 지적되고 있는데 PM2.5에 의한 오염도와 천식, 폐렴, 그리고 기관지염과 같은 호흡기 질환에 의한 입원 증가와의 관련성은 이미 입증된 바 있다²³⁻²⁵. 또한 미국동부지역 6개 도시를 대상으로한 대규모 역학 연구에 의하면 PM2.5가 10 μ g/m³ 증가시 마다 총 사망률이 1.7% 증가하는데 만성폐색성 폐질환에 의한 사망률증가는 3.3% 그리고 폐렴에 의한 사망률 증가는 4.0%에 달한다는 보고 등 PM2.5의 오염도가 호흡기 질환으로 인한 사망에 미치는 영향도 보고된 바 있다⁴.

PM2.5에 의한 호흡기질환 발생 및 악화의 기전을 밝히고자 하는 많은 연구들이 진행되고 있으나 대부분이 디젤엔진을 가동함에 의하여 발생하는 DEP를 이용한 연구들이다. 도심지역에서 발생하는 PM2.5의 주요 성분이 DEP이며 손쉽게 다량 채취가 가능하기 때문이다. 그러나 도심지역의 PM2.5에도 다른 발생원에 의한 분진도 포함되어 있으며 시기나 지역에 따라 PM2.5의 구성은 변이가 큼으로¹⁰ 우리나라에서

채취된 PM2.5를 이용한 연구가 필요하며 이를 우리나라의 역학적인 연구와 연관시켜 해석하는 것이 필요할 것이다.

PM2.5는 질량이 작아서 실험관내 실험이나 동물실험에 이용할 만큼 다량의 분진을 얻기 힘들기 때문에 우리나라는 물론 외국에서도 실험하기가 용이하지 않으나 본연구에서는 약 6개월간 high volum sampler를 이용하여 다량 채취한 PM2.5를 실험에 이용하였다.

PM2.5의 흡입에 따라 폐장세포에 IL-8이나 GM-CSF와 같이 NF κ B에 의하여 조절되며 폐장의 염증 반응을 유도하는 기능을 가진 유전자가 발현 증가됨이 알려지면서¹¹⁻¹³ PM에 의한 NF κ B의 활성화 및 그 기전에 대한 연구에 관심이 집중되었다. 폐상피세포를 PM이나 DEP로 자극하였을 때 NF κ B가 활성화되는 것은 증명되었으나 그 활성화 기전은 명확하지 않다^{14,15}.

NF κ B는 oxidant stress에 의하여 활성화되는 전사인자임으로 PM에 의한 NF κ B의 활성화는 oxidant 의존적으로 이루어질 것이라는 일반적인 의견이다. NF κ B는 I κ B라는 inhibitory subunit와 결합되어 세포질내에 존재하고 이 I κ B가 분해됨으로서 NF κ B가 활성화됨은 이미 주지의 사실이다¹⁸. 본연구에서 PM2.5로 자극하였을 때 I κ B α 의 분해가 분진자극 30분 후부터 나타났으며 2시간째 가장 많이 파괴되었다. 그렇지만 PM2.5에 의한 NF κ B의 활성화에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었던 ROS의 분비증가는 관찰되지 않았다. 분진으로 자극하였을 때 대식세포²⁰나 섬유모세포²¹에서 즉각적인 ROS의 증가는 보고되고 있으나 폐상피세포의 즉각적인 반응은 확인되지 않았다. 1999 Barrett들은 MLE-15 쥐의 폐상피세포를 규산분진으로 자극하였을 때 즉각적인 ROS의 생산이 관찰되지 않았으며 약 3시간 후에야 ROS의 분비증가가 관찰되었다고 보고하였다²². 또한 본연구실예 실시한 연구에서도 사람의 폐상피세포 세포주인 A549를 규산분진으로 자극하고 2시간까지 관찰하였을 때 ROS가 증가되지 않았으나 I κ B α 는 분해되어 NF κ B가 활성화되었음을 시사하고 있었다. 따라서 폐상피세

포에서 분진에 의한 NF κ B 활성화는 ROS 이외의 다른 과정이 존재 할 것으로 생각된다.

Oxidative stress 뿐만 아니라 nitrosative stress 도 유전자의 전사과정을 조절하는 역할을 가지고 있다. RNS와 NF κ B의 신호전달과정은 밀접하게 연관되어 있는데 RNS가 NF κ B의 활성화 과정에 관여할 뿐 아니라 L-arginine으로부터 NO가 합성되는데 관여하는 iNOS가 NF κ B에 의하여 조절받는다²⁶. 폐상피세포에서 NOS의 3가지 isoform 중 eNOS나 nNOS는 검출되지 않았고 iNOS 만이 확인되었던 바³¹ 폐상피세포의 NO 합성도 iNOS에 의하여 이루어 지는 것으로 생각되고 있음으로 PM2.5에 의한 폐상피세포의 iNOS 발현 및 NO 합성에 NF κ B가 관여할 수 있을 것이다. 그러나 NF κ B에 의한 조절과정 이외의 다양한 신호전달과정에 의하여 iNOS의 발현이 조절된다는 연구결과들이 보고되고 있다. LPS를 주입하고 15분안에 폐포대식세포와 말초혈액의 대형핵 백혈구의 iNOS mRNA 발현증가와 이 세포들로부터의 RNS 분비증가가 보고되어 NF κ B과 관계없는 즉각적인 반응을 보이는 조절과정이 존재할 수 있다는 의견이 보고되었다²⁷⁻²⁸. 그리고 1996년 Greenberg 등은 iNOS의 유전자 발현을 조절하는데 있어 NF κ B와 무관한 purine-2-receptor와 cyclic AMP에 의한 조절기전이 존재하며 이는 즉각적인 RNS의 분비증가와 관련된다고 보고한 바 있다³⁰. 본연구에서 PM2.5로 A549 세포를 자극하였을 때 즉각적으로 NO의 분비가 증가되었으며 iNOS의 mRNA 발현도 증가되었다. 시간적인 경과로 보건데 PM2.5 자극에 의한 A549세포의 즉각적인 iNOS 유전자 발현증가와 그에 따른 NO의 분비증가는 NF κ B가 활성화되기 전에 이루어 졌으므로 NF κ B 의존적이 아닌 다른 조절과정에 의한 것으로 생각된다. 그러나 iNOS의 증가를 유도하는 상류과정에 대해서는 아직 확실하지 않으며 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

RNS가 NF κ B의 활성화 과정에 미치는 영향은 자극이나 반응세포의 종류에 따라 다르게 나타난다. 사

람의 임파구나 쥐의 폐상피세포에서는 RNS가 NF κ B를 활성화시키는 반면 간세포나 혈관내피세포에서는 억제한다¹⁸. 또한 NO의 농도에 따라 반응이 달라진다는 보고도 있었는데 0.1-10 μ M의 저농도에서는 NO가 NF κ B를 활성화시키는 반면 0.2-0.5 mM의 고농도에서는 NF κ B 활성화를 억제한다고 한다. 자극체로서 PM2.5를 이용한 연구는 없었으나 쥐의 폐상피세포를 이용한 기존의 연구에서 NO가 NF κ B를 활성화시켰으며 본연구에서 PM2.5에 의하여 분비증가된 NO의 농도가 500 μ g/cm³의 PM2.5로 처리한 경우에도 10 μ M을 넘지 않았다. 그리고 iNOS 억제제인 L-NIL로 처리한 경우에도 NF κ B의 활성화가 억제되었던 바 폐상피세포에서 PM2.5에 의하여 즉각적으로 생산증가된 NO가 NF κ B의 활성화 과정에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

요 약

연구배경 :

PM2.5는 호흡기질환의 악화 및 호흡기 질환에 의한 사망률과 밀접한 관계가 있다. PM2.5에 의한 호흡기 염증반응의 악화가 그 원인으로 생각되나 염증반응의 조절기전은 확실하지 않다. 본연구에서는 PM2.5에 의한 폐장의 염증반응을 조절하는데 중요한 역할을 하는 전사인자인 NF κ B의 활성화 기전을 알아보아 염증 조절기전에 대한 이해를 높이고자 시도되었다.

방 법 :

폐상피세포주인 A549 세포에서 PM2.5 자극에 의한 NF κ B의 활성화 및 ROS, 그리고 RNS 분비를 관찰하였다. iNOS 억제제인 L-NIL가 NF κ B 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

결 과 :

PM2.5는 A549 세포에서 NF κ B의 활성화를 유도하였다. PM2.5로 A549 세포를 자극시 즉각적인 RNS의 분비는 관찰되었으나 명확한 ROS의 증가는 관찰되지 않았다. RNS 억제제인 L-NIL 처리시

NF κ B 활성화는 억제되었다.

결론:

A549 세포에서 PM2.5에 의하여 유도된 즉각적인 NF κ B 활성화 과정에는 RNS가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Dockery DW, CA Pope, X Xu, DJ Spengler, JH Ware, ME Fay, BG Ferris Jr, FE Speizer. An association between air pollution and mortality in six US cities. *N Engl J Med* 1993;329(24):1753-9.
2. Schwartz J. Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis. *Environ Res* 1994;64:36-52.
3. Dockery DW, FE Speizer, DO Stram, JH Ware, JD Spengler, BG Ferris Jr. Effects of inhalable particles on respiratory health of children. *Am Rev Respir Dis* 1989;139(3):587-94.
4. Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate and air pollution and mortality in 20 U. S. cities. *N Engl J Med* 2000;343:1742-9.
5. Schwartz J, Dockery DW, NEas LM. Is daily mortality associated specifically with fine particles? *JAMA* 1996;46(10):927-39.
6. Schwartz J, Neas LM. Fine particles are more strongly associated than coarse particles with acute respiratory health effects in school children. *Epidemiology* 2000;11:6-10.
7. Salvi SS, A Frew, S Holgate. Is diesel exhaust a cause for increasing allergy? *Clin Exp Allergy* 1999;29:4-8.
8. Westerholm RN, A Jacob, H Li. Chemical and biological characterization of particulate-, semivolatile-, and gas-phase-associated compounds in diluted heavy-duty diesel exhausts: a comparison of three different semivolatile-phase samplers. *Environ Sci Technol* 1991;25:332-8.
9. V Castranova, JYC Ma, HM Yang, JM Antonini, Leon Butterworth, MW Barger, Roberts J, JKH Ma. Effect of exposure to diesel exhaust particles on the susceptibility of the lung to infection. *Environ Health Perspect* 2001;109(suppl 4):609-12.
10. Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society. Health effects of outdoor air pollution. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:3-50.
11. Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, Ohtoshi T, Miyabara Y, Sagai M, Davies RJ. The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18(3):441-8.
12. Boland S, Bonvallot V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier MA, Marano F. Mechanism of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 2000;278:L25-L32.
13. Steerenberg PA, Zonnenberg JAJ, Dormans JAMA, Joon PNT, Wouters IM. Diesel Exhaust particles induced release of IL6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) in vitro. *Exp Lung Res* 1998;24:85-100.
14. Takizama H, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Desaki M, Kasama T, Kobayashi K, Najahara K, Yamamoto K, Matsushima K, Kudohs S. Diesel exhaust particles induce NF κ B activation in human bronchial epithelial cells in vitro: importance in cytokine transcription. *J Immunol* 1999;162:4705-11.
15. Baeza-Squiban A, Bonvallot V, Boland S, Marano F. Diesel exhaust particles increase NF κ

- B DNA binding activity and c-fos proto-oncogene expression in human bronchial epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 1999;13:817-22.
16. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 1993;12:2005-15.
 17. Bonvallot V, Baeza-Squiban A, Boland S, Marano F. Activation of transcription factors by diesel exhaust particles in human bronchial epithelial cells in vitro. *Inhalation Toxicology* 2000; 12(suppl 3):359-64.
 18. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J* 2000;14:1889-900.
 19. Adler KB, BM Fischer, DT Wright, LA Cohen, S Becker Interactions between respiratory epithelial cells and cytokines; relationships to lung inflammation. *Ann Ny Acad Sci* 1994;725:128-45.
 20. Lim Y, Kim SH, Cho YJ, Kim KA, Oh MH, Lee KH. Silica-induced oxygen radical generation in alveolar macrophage. *Ind Health* 1997;35:380-7.
 21. Cho YJ, Seo MS, Kim JK, Lim Y, Chae GT, Ha KS, Lee KH. Silica-induced generation of reactive oxygen species in rat2 fibroblast: role in activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:708-12.
 22. Barrett EG, Johnston C, Oberdorster G, Finkelstein JN. Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF α -induced oxidant stress. *Am J Physiol* 1999;276:L979-88.
 23. Ostro BD. The association of air pollution and mortality; examining the case for inference. *Arch Environ Health* 1993;43:336-42.
 24. Dockery DW, Pope CA. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Ann Rev Public Health* 1994;15:107-32.
 25. Pope CA, Dockery DW, Schwartz J. Review of epidemiological evidence of health effects of particulate air pollution. *Inhal Toxicol* 1998;7:1-8.
 26. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994;269:4705-8.
 27. Kolls JK, Xie J, Lei D, Greenberg SS, Summer WR, Nelson S. Differential effects of in vivo ethanol on LPS-induced TNF and nitric oxide production in the lung. *Am J Physiol* 1995;268:L991-8.
 28. Xie J, Kolls J, Bagby G, Greenberg SS. Independent suppression of nitric oxide and TNF alpha in the lung of conscious rats by ethanol. *FASEB J* 1995;9:253-61.
 29. Greenberg SS, Xie J, Zhao X, Jie O, Giles TD. An in vivo cytokine and endotoxin-independent pathway for induction of nitric oxide synthase II mRNA, Enzyme and nitrate/nitrite in alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;22:160-7.
 30. Watkins DN, Peroni DJ, Basclain KA, Garlepp MJ, Thompson PJ. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16:629-39.