

# 랫트의 기관내 Fe 노출후 Fe 이동에 대한 연구

권 민, 최병선, 박언섭<sup>1)</sup>, 정남현<sup>2)</sup>, 박성조<sup>3)</sup>, 임 영<sup>4)</sup>, 박정덕

중앙대학교 의과대학 예방의학교실, 중앙대학교 의과대학 병리학교실<sup>1)</sup>, 고려대학교 생명환경과학대학<sup>2)</sup>, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Clinic and Foundation, Rochester, USA<sup>3)</sup>, 가톨릭대학교 성모병원 산업의학과<sup>4)</sup>

## The Mechanism of Iron Transport after Intratracheal Instillation of Iron in Rats

Min Kwon, Byung-Sun Choi, Eon-Sub Park<sup>1)</sup>, Nam-Hyun Chung<sup>2)</sup>, Sungjo Park<sup>3)</sup>, Young Lim<sup>4)</sup>, Jung-Duck Park

Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University, Department of Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University<sup>1)</sup>, College of Life and Environmental Sciences, Korea University<sup>2)</sup>, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Clinic and Foundation, Rochester, USA<sup>3)</sup>, Department of Occupational and Environmental Medicine, St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea<sup>4)</sup>

**Objectives :** Iron (Fe) is an essential element in biological processes; however excessive Fe is harmful to human health. Some air pollutants contain a high level of Fe, and the human lung could therefore be over-exposed to Fe through inhaled air pollutants. This study was performed to investigate the role of metal transporters (divalent metal transporter 1, DMT1, and metal transporter protein 1, MTP1) in the lung under the environments of Fe deficiency in the body and Fe over-exposure in the lung.

**Methods :** Rats were fed Fe deficient (FeD, 2-6 mg Fe/kg) or Fe supplemented (FeS, 120 mg Fe/kg) diet for 4 weeks, followed by a single intratracheal instillation of ferrous sulfate at low (10 mg/kg) or high (20 mg/kg) dose. Fe concentration was analyzed in the serum, lung and liver, and histopathological findings were observed in the lung at 24 hours after Fe administration. The level of DMT1 and MTP1 expression in the lung was analyzed by RT-PCR. Also, the effect of Fe deficiency in the body was evaluated on the level of Fe concentration and metal transporters compared to FeS-diet fed rats at the end of 4-week FeD or FeS diet.

**Results :** The 4-week FeD diet in rats induced an Fe deficiency anemia with decreased serum total Fe, increased unsaturated Fe binding capacity and hypochromic microcytic red blood cells. The concentration

of Fe in the lung and liver was lower in the FeD-diet fed rats than in the FeS-diet fed rats. The level of metal transporters mRNA expression was higher in the FeD-diet fed rats than in the FeS-diet. The concentration of Fe in the lung was increased in a dose-dependent pattern after intratracheal instillation of Fe into the rats, while the level of Fe in the serum and liver was not increased in the low-dose Fe administered rats. Therefore, DMT1 and MTP1 mRNA was highly expressed in both FeD-diet and FeS-diet fed rats, after intratracheal instillation of Fe.

**Conclusions :** DMT1 and MTP1 mRNA were more highly expressed in FeD-diet fed rats than in FeS-diet fed rats. The over-exposure of Fe intratracheally induced high expression of metal transporters and increased Fe deposition in the lung in both FeD-diet and FeS-diet fed rats, but did not increase the Fe level of the serum and liver in low-dose Fe administered rats. These results suggest that the role of metal transporters in the lung might be different in a part from the duodenum under the environment of over-exposure to Fe.

J Prev Med Public Health 2004;37(4):329-336

**Key Words:** iron, Divalent metal transporter 1 (DMT1), Metal transporter protein 1 (MTP1), Intratracheal, Lung

## 서 론

철(iron, Fe)은 생체의 물질대사에 필수적인 금속이온으로서 체내에서 항상성(homeostasis)을 유지하려고 한다. 일반적으로 Fe의 체내 항상성은 체내에서 Fe가 부족하거나 또는 Fe의 요구량이 증가되는 경우 소장에서의 Fe 흡수가 증가됨으로써 조절된다. Fe는 필수금속이온이지만 체내

에서 과다하게 노출되는 경우 여러 가지 건강장애를 유발한다 [1,2].

디젤 자동차로부터 배출되는 배기물은 대기오염의 주요 오염물질이며, 비교적 높은 농도의 Fe를 함유하고 있다. 이와 같은 대기오염 물질에 장기간 노출되면 폐에서의 Fe농도 증가와 만성호흡기계 질환의 유병률 증가 및 다양한 폐 손상을 초래할 수 있다 [3]. Ghio 등 [4]은 DEP(diesel

exhaust particulate)를 랫트의 기관지내로 노출한 경우 폐조직내 Fe 농도가 증가되고 이로 인한 oxidative stress로 인해 폐의 손상이 초래된다고 보고하였다. 즉, 대기오염이 심한 공업지역이나 대도시에서 거주하는 사람들은 중금속에 오염된 미세분진을 흡입함으로써 폐조직의 Fe에 대한 노출이 증가 될 수 있을 것으로 추정된다. 호흡기계를 통한 과잉의 Fe에 대한 노출과 이로 인한 흡수 및 건강장애는 공중보건학적인 측면에서 매우 중요할 것으로 생각되며, 호흡기계에서의 Fe 흡수와 독성기전에 대

접수: 2004년 5월 4일, 채택: 2004년 6월 22일

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의해 연구되었음(KRR-2002-042-E00029).

책임저자: 박정덕(서울시 동각구 옥석동 221번지, 전화: 02-820-5668, 팩스: 02-815-9509, E-mail: jtpark@cau.ac.kr)

한 연구가 요구되나 아직까지 이에 대한 연구가 많지 않은 실정이다.

소화기계에서의 Fe의 흡수와 조절기전에 대해서는 최근까지 비교적 많은 연구가 진행되고 있는 편이다. 즉, 장관내로 들어온  $Fe^{2+}$ 가 ferrireductase에 의해  $Fe^{3+}$ 로 환원되어  $Fe^{3+}$  상태로 장관상피세포내로 유입된다 [5]. 장관세포로 흡수된 Fe는 인체의 요구량에 따라 혈액으로 이동되거나 장관상피세포에 남게 된다. 혈액으로 들어온 Fe는 운반 단백질인 transferrin과 결합하여 필요한 곳으로 이동되고, 장관세포에서는 Fe가 apoferritin과 결합하여 ferritin의 형태로 저장된다 [6]. 체내 철분의 양이 부족할 경우, 혈액내 포화되지 않은 transferrin의 양이 많아져 소장에서 흡수된 철분은 대부분 혈액으로 이동되며 철분 흡수율도 증가하게 된다. 최근 Fe 이동에 관련하는 단백질 즉, DMT1(Divalent Metal Transporter-1, DCT1, NRAMP2)과 MTP1(Metal Transporter Protein-1, ferroportin1, Ireg1)이 소장에서 Fe의 이동과 조절에 관여하는 것으로 보고 된 바 있다 [7-9]. 즉, DMT1은 소장 특히 십이지장의 apical portion에 위치하여 체내에서 Fe가 부족하거나 Fe의 요구량이 증가되는 환경에서 발현이 증가되어 장관으로부터 소장상피세포로 Fe의 흡수를 증가시키며 [7,10-14], MTP1은 소장상피세포의 기저부에 존재하며 소장상피세포로부터 순환혈관내로 Fe를 이동시킴으로서 [13] 체내 Fe의 항상성을 유지한다. DMT1과 MTP1은 체내 대부분의 장기에서 발현되어 각 조직에서의 Fe 이동에 관여할 것으로 추정되고 있으나 폐에서의 발현정도과 Fe의 이동에 대한 연구는 아직까지 매우 부족한 편이다.

지금까지의 역학적 연구와 동물실험 자료를 근거로 볼 때 부적절한 Fe의 공급으로 인하여 체내 Fe가 부족한 경우 생활환경을 통해 동일량의 Fe에 노출되더라도 소장에서 그 흡수량이 증가될 것으로 생각된다. 만약 체내 Fe 수준에 따라 폐조직에서 Fe 이동에 관련하는 단백질(DMT1과 MTP1)의 발현정도에 변화가 초래되고 호흡기계를 통해 노출되는 Fe의 흡수와 이동에 관여한다면 체내 Fe가 부족한 환경에

있는 사람들의 경우 DEP와 같이 비교적 많은 양의 Fe를 함유하고 있는 대기오염물질에 동일량 노출되더라도 폐를 통해 상대적으로 많은 양의 Fe에 노출될 가능성이 있다. 더욱이 우리나라는 아직까지 성장기 젊은 여성, 임산부, 갱년기 여성 등 Fe 부족이 초래될 수 있는 다수의 대상이 있다. 그러므로 체내 Fe의 정상수준에서 뿐만 아니라 낮은 수준에서 호흡기계를 통한 폐에서의 Fe 이동에 관여하는 DMT1과 MTP1 등과 같은 단백질들의 역할에 대한 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 체내 Fe 수준이 정상인 실험동물과 Fe가 결핍된 실험동물을 이용하여 체내 Fe 수준에 따른 금속 이동 단백질의 발현정도를 비교하고, 실험동물의 기관지내로 Fe를 노출시킨 후 폐조직에서 DMT1과 MTP1의 발현정도 및 폐와 간장에서의 Fe 농도를 비교함으로써 폐에서 금속 이동 단백질의 역할을 알아보고자 하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 연구에 사용된 실험동물은 21일령의 수컷 Sprague-Dawley rat를 Samtaco사로부터 구입하여 이용하였다. 구입한 실험동물은 온도 약 22°C, 습도 55%, 채광 12시간인 동물사육실에서 사육하여 특별한 이상이 없음을 확인한 다음 실험에 사용하였다.

### 2. 실험모델

Fe 결핍 실험동물 모델은 Fe 결핍식이를 이용하여 만들었다. 즉, 생후 25일된 실험동물을 실험군과 대조군으로 구분하였고, 실험군에는 Fe 결핍식이(FeD diet)를 공급하였고 대조군에는 Fe 정상식이(FeS diet)를 공급하였다. 실험동물의 식이는 American Institute of Nutrition의 권장량을 근거로 하여 Fe 결핍식이는 2-6 mg Fe/kg, Fe 정상식이는 120 mg Fe/kg이 되도록 조성을 조절하였다 (Table 1). Fe 결핍 식이는 Fe 농도 이외에는 Fe 정상 식이와 동일한 구성 성분으로 조성하였다. 각 군의 실험동물에 Fe 결핍식이 또는 Fe 정상식이를 4

주 동안 공급하였다. 이때 물은 증류수를 공급함으로써 Fe가 추가로 공급되는 것을 방지하였다. 실험기간 동안 주당 2-3회 체중을 측정하여 실험동물의 체중변화를 관찰하였다. 4주 동안 Fe 결핍식이 또는 Fe 정상식이로 사육한 실험동물을 마취제를 이용하여 마취시킨 후 Fe를 1회 실험동물의 기관지내로 intratracheal instillation 방법으로 투여하였다. 이때 Fe 결핍군 또는 Fe 정상군을 각각 3군으로 구분하여 생리적 식염수, 실험동물 체중 kg당 10 또는 20 mg의 ferrous sulfate( $FeSO_4$ , Sigma)를 투여하였다. 투여량은 실험동물 체중 100 g당 0.1 ml가 되도록 조절하였다.

### 3. 시료채취

실험동물에 ferrous sulfate를 1회 intratracheal instillation 방법으로 주입한 다음 24시간 후에 경추탈골방법으로 실험동물을 희생시켜 즉시 혈액을 채취하고 폐, 간을 적출하였다. 이때 폐의 한쪽은 DMT1과 MTP1 mRNA 발현을 확인하기 위하여 적출한 후 즉시 액체질소에 넣은 다음 -80°C의 deep freezer로 이동하여 추후 분석 때까지 냉동·보관하였고 나머지 한쪽은 Fe 정량에 이용하였다. 채취한 혈액은 원심 분리하여 혈청을 분리하였다.

### 4. 실험동물의 체내 Fe 상태 평가

실험동물의 체내 Fe 부하 정도는 혈청내 총 Fe 량, unsaturated iron binding capacity (UIBC) 및 말초혈액 도말소견 등을 이용하여 관찰하였다. 즉, 혈청내 총 Fe와 UIBC는 Sigma Diagnostic Kit(USA)를 이용하여 정량하였다. 실험동물의 말초혈액소견은 전혈을 슬라이드 글라스에 도말하여 광학현미경을 이용하여 x1000배에서 관찰하였다.

### 5. 조직 내 Fe 정량

폐, 간에서 Fe를 정량하기 위하여 적출된 조직에 유해 금속 분석용 농질산(Junsee Chem. Co.)을 첨가하여 극초단파 회화기(Microwave Digestion System, MDS-2000, CEM Co.)를 이용하여 습식·회화하였다. 회화액에 함유된 Fe는 원자흡광분광도

계(Atomic Absorption Spectrophotometer, Perkin Elmer Model 5100)를 이용하여 flame 방법으로 분석하였다. 조직 내 Fe 농도는  $\mu\text{g/g wet weight}$ 로 환산하여 나타내었다.

6. 조직병리학적 소견 관찰

생리적 식염수 또는 Fe를 투여한 Fe 정상식이군과 Fe 결핍식이군 실험동물로부터 얻은 일정 부위의 폐조직을 10% 포르말린 용액에서 48시간 동안 침적·고정하였다. 이후 통상적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 4  $\mu\text{m}$  절편으로 만들어 hematoxylin-eosin 염색하여 광학현미경으로 형태학적 이상소견을 관찰하였다.

7. DMT1과 MTP1 mRNA 분석

폐조직내 DMT1과 MTP1 mRNA의 발현 정도는 RT-PCR방법을 이용하여 분석하였다. 즉, 폐조직으로부터 Tri Reagent<sup>®</sup>

(Molecular Research Center, Inc.)를 이용하여 총 RNA를 분리하였으며, 분리된 각각의 RNA는 분광광도계를 이용하여 260 nm에서 정량하고 formaldehyde agarose gel 전기영동방법으로 확인하였다. 폐조직에서 얻은 RNA로부터 first strand cDNA를 Roche社로부터 구입한 1st strand cDNA synthesis kit를 이용하여 제작하였다. 즉, RNA를 65  $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 보온한 후 얼음에서 식힌 다음 미리 준비된 RT mixture(10x reaction buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, deoxynucleotide mix, random primer, RNase inhibitor, AMV reverse transcriptase 등)에 2  $\mu\text{g}$ 의 RNA를 첨가하여 42  $^{\circ}\text{C}$  1시간, 94  $^{\circ}\text{C}$  10분, 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시켜 cDNA를 얻었다. 제작한 cDNA로부터 PCR 방법을 이용하여 DMT1 또는 MTP1만을 특이적으로 증폭시켰다. 즉, cDNA를 미리 준비된 PCR mixture(10x Taq buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA, dNTP, up and down primer 등)에 2  $\mu\text{l}$  첨가한 후 25 또는 30 cycle의 PCR 반응(94  $^{\circ}\text{C}$  5분, 94  $^{\circ}\text{C}$  60초, 55  $^{\circ}\text{C}$  60초, 72  $^{\circ}\text{C}$  60초)를 시행하였다. 이때 특이적으로 DMT1 또는 MTP1을 증폭하기 위하여 Gene Bank로부터 얻은 랏트의 DMT1(Accession No. AF008439)과 MTP1(Accession No. AF394785)의 complete coding sequence를 이용하여 [7,12] 미리 주문 제작한 특이적인 probe(5' primer, ATCCAGACGATGGTGCTTC; 3' primer, TTGGGATACTGACGGTGACA for DMT1,

5' primer, CCCTGCTCTGGCTGTA AAAAG; 3' primer, AACAAAGCCACATTTTCGAC for MTP1)를 이용하였다. DMT1과 MTP1의 발현정도를 표준화하기 위하여 GAPDH (Accession No. AF106860; 5' primer, ACATCAAATGGGGTGATGCT; 3' primer, ACTGTGGTCATGAGCCCTTC for GAPDH)를 internal standard로 사용하였다. PCR 결과 얻은 증폭된 DNA는 2% agarose gel을 이용하여 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 확인하였다.

8. 자료분석

연구 결과 얻은 자료의 통계학적 분석은 SAS package (version 8.01)를 이용하였으며 평균+표준오차로 나타내었다. 각 군 간의 평균치 비교는 t-검정과 ANOVA 및 Duncan 다중검정을 이용하였다.

연구결과

1. 체중변화

Fe 정상식이군과 Fe 결핍식이군을 공급한 실험동물의 체중은 두 군 모두에서 관찰기간동안 지속적으로 증가되었다 (Figure. 1). 체중증가의 양상은 Fe 정상식이 또는 Fe 결핍식을 공급한 후 약 15일까지는 두 군 간에 비슷하였으나 15일 이후에는 Fe 결핍식을 공급한 군이 Fe 정상식이군에 비해 체중증가가 다소 적은 것으로 관찰되었다.

2. Fe 결핍 식이에 의한 효과

Fe 결핍식을 4주 동안 공급한 실험동물에서의 혈액학적 소견은 Fe 정상식이군에 비해 Fe 결핍소견을 나타내었다. 즉, Fe 결핍식이군에서의 혈청내 총 Fe량은 40.8  $\mu\text{g/dl}$ 로서 Fe 보완식이군 207.1  $\mu\text{g/dl}$  보다 낮았고, UIBC는 Fe 결핍식이군이 468.0  $\mu\text{g/dl}$ 로서 Fe 정상식이군 374.0  $\mu\text{g/dl}$  보다 높았다 (Figure. 2-A). 말초혈액 도말소견에서는 Fe 결핍식이군에서는 저색소성 소적혈구가 관찰되었으나 Fe 정상식이군에서는 정상적인 혈액소견이 관찰되었다 (Figure. 2-B). 폐와 간조직내 Fe 농도는 Fe 결핍식이군에서 각각 47.4  $\mu\text{g/g wet weight}$ , 29.7  $\mu\text{g}$

**Table 1.** The formulae of FeS (iron sufficient) and FeD (iron deficient) diet for rats (unit: g/kg)

Ingredient	FeS-Diet	FeD-Diet
Casein	200.0	200.0
DL-Methionine	3.0	3.0
Sucrose	549.39	549.99
Com Starch	150.0	150.0
Com Oil	50.0	50.0
Mineral Mix, Fe Defic. (TD 81062)	35.0	35.0
Ferrous Sulfate FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.6	0.0
Vitamin Mix, AIN-76A (40077)	10.0	10.0
Choline Bitartrate	2.0	2.0
Ethoxyquin (antioxidant)	0.01	0.01

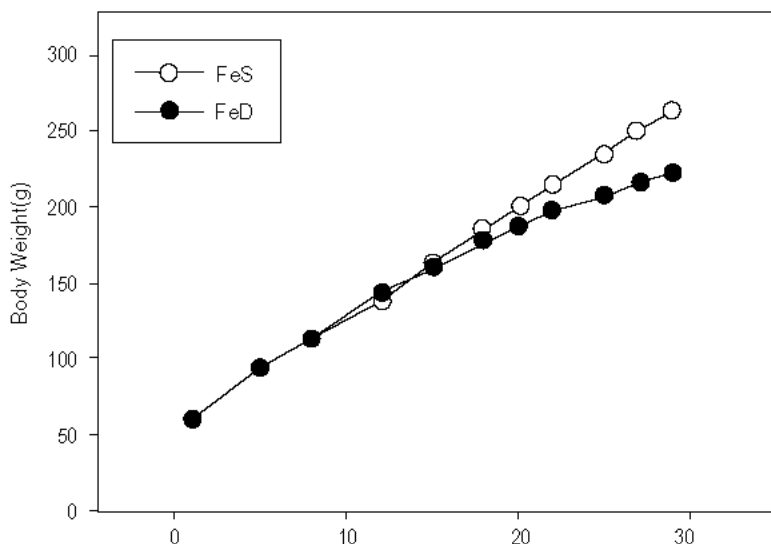


Figure 1. The change of body weight in FeS-diet or FeD-diet fed rats. Data are represented as mean +SE.

/g wet weight로서 Fe 정상식이군에 비해 71.3  $\mu\text{g/g}$  wet weight, 간 112.8  $\mu\text{g/g}$  wet weight에 비해 낮았다 (Figure. 3-A). 실험동물의 폐에서 RT-PCR 방법으로 분석한 DMT1과 MTP1 mRNA의 발현은 Fe 정상식이군에 비해 Fe 결핍식이군에서 DMT1은 약 1.7배, MTP1은 약 1.3배 높은 것으로 관찰되었다 (Figure. 3-B).

### 3. 기관지내 Fe 노출에 따른 효과

#### 1) 폐조직의 Fe 수준

실험동물 체중 kg당 10 또는 20 mg의 Fe를 1회 기관지내로 노출하였을 때, 폐조직내 Fe 농도는 Fe 정상식이군과 Fe 결핍식이군 모두에서 Fe 노출 양에 따라 양-반응 관계를 나타내어 실험동물 체중당 Fe 10 mg 투여군에서부터 saline 투여군에 비해 높은 것으로 관찰되었다 (Figure. 4).

#### 2) 혈청 및 간장내 Fe 수준

혈청내 총 Fe는 Fe 10 mg 투여군에서는 Fe 정상식이와 Fe 결핍식이군 모두에서 saline 투여군과 차이가 없었으나 20 mg을 투여하

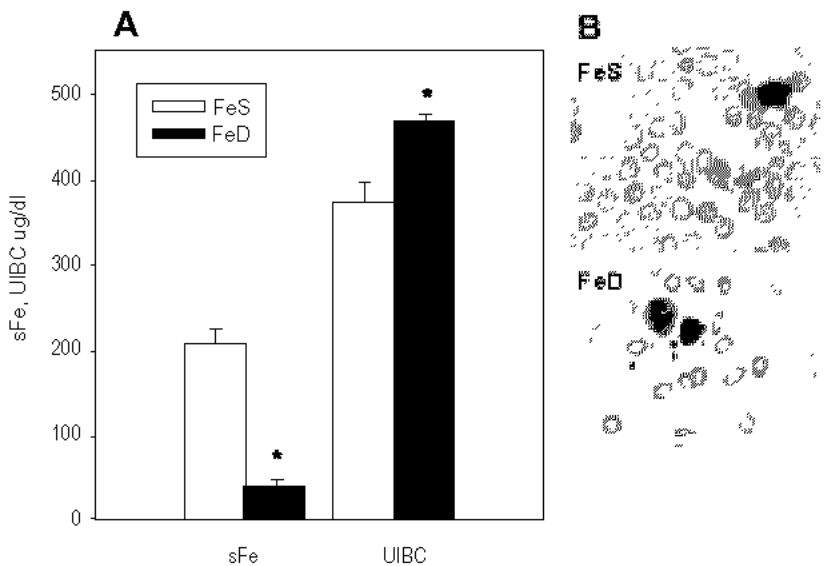
였을 때 Fe 결핍식이군에서 혈청내 총 Fe가 saline 투여군에 비해 높게 나타났다 (Figure. 5-A). Fe 정상식이군 및 Fe 결핍식이군 실험동물에 10 mg/kg 용량의 Fe를 기관지내로 투여하였을 때 간장에서의 Fe 농도는 두 군 모두에서 saline 투여군과 비슷한 수준이었으나, Fe 20 mg을 투여한 군에서는 Fe 정상식이 실험동물과 Fe 결핍식이 실험동물 모두에서 saline 투여군에 비해 높은 것으로 관찰되었다 (Figure. 5-B).

#### 3) 조직병리학적 소견

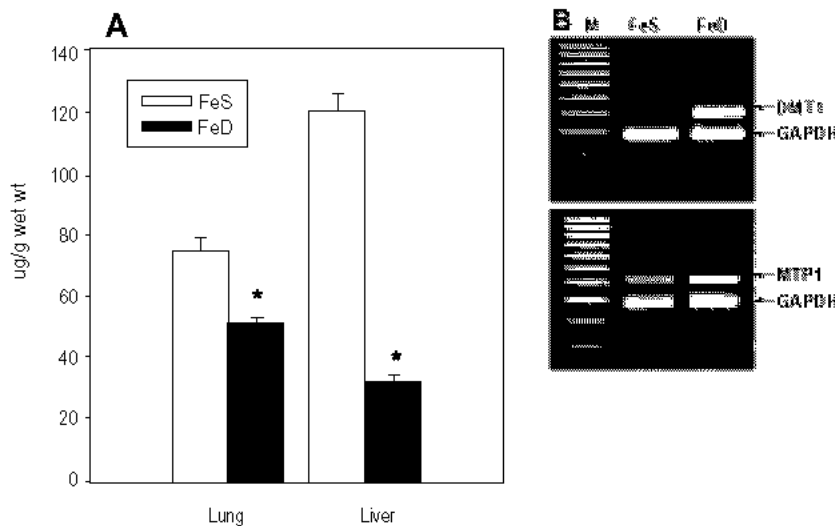
Fe 정상식이 또는 Fe 결핍식을 각각 4주 동안 공급한 실험동물에서 기관지내로 saline, 10 또는 20 mg/kg 용량의 Fe를 투여한 후 24시간에서 관찰한 폐조직의 형태학적 소견은 그림 6과 같다. 즉, saline을 투여한 Fe 정상식이 또는 Fe 결핍식이군 실험동물의 폐조직은 정상적인 형태의 폐포와 간질이 유지되었다. 10 mg/kg 용량의 Fe 투여군에서는 Fe 정상식이군과 Fe 결핍식이군 모두에서 경도에서 중등도의 부종과 더불어 폐포내에 삼출액과 함께 염증세포의 침윤이 관찰되었으며 부분적인 폐포구조의 파괴와 일부 종말 기관지에서 염증세포가 관찰되었다. 20 mg/kg 용량의 Fe 투여군에서는 부종과 염증 및 폐포구조의 파괴가 10 mg군에 비해 더욱 심해졌으며 폐포내 과사성 물질에 부분적인 석회화도 관찰되었다 (Figure. 6).

#### 4) DMT1과 MTP1 mRNA 발현

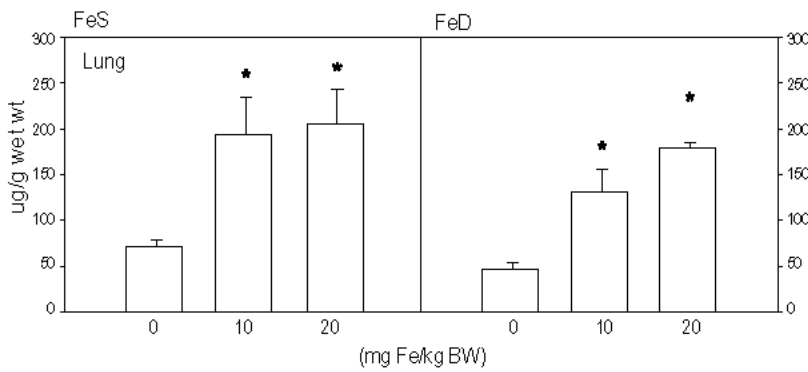
Fe 정상식이 또는 Fe 결핍식을 4주 동안 공급한 실험동물의 체중 kg당 10 mg 또는 20 mg의 Fe를 기관지내로 1회 노출시킨 후 폐조직에서 Fe 이동에 관여하는 단백질인 DMT1의 발현정도를 mRNA 수준에서 관찰한 결과, Fe 정상식이군에서는 Fe 10 mg과 20 mg 투여군에서 saline 투여군에 비해 약 1.5-1.7배 높게 발현되었고, Fe 결핍식이군에서는 Fe 10 mg 투여군에서 saline 투여군에 비해 약 11% 증가되었으나 Fe 20 mg 투여군에서는 비슷한 수준으로 관찰되었다 (Figure. 7-A). 폐조직에서의 MTP1 mRNA의 발현은 철 10 또는 20 mg/kg 투여군에서 saline 투여군에 비해 Fe 정상식이군에서는 약 1.6-1.7배, Fe 결핍식이군에서는 약 1.1-1.4배 높은 것으로 관찰되었다 (Figure. 7-B).



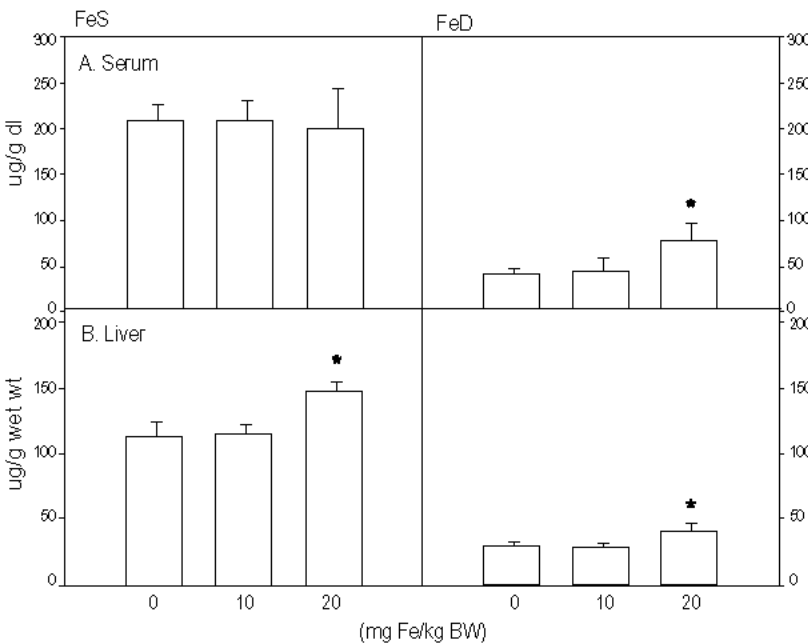
**Figure 2.** Serum Fe status and microscopic findings of peripheral blood in FeS-diet or FeD-diet fed rats (A. sFe : serum total Fe, UIBC : unsaturated iron binding capacity) ; (B. upper panel : FeS-diet fed, lower panel : FeD-diet fed). Asterisk (\*) indicates FeD-diet fed rats are significantly different from FeS-diet fed rats ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3.** A : Fe concentration in lung and liver of rats. B : Expression level of DMT1 mRNA(upper panel) and MTP1 mRNA(lower panel) in the lung. Asterisk (\*) indicates FeD-diet fed rats are significantly different from FeS-diet fed rats ( $p < 0.05$ ).



**Figure 4.** The concentration of Fe in lung after intratracheal instillation with Fe in FeS-diet or FeD-diet fed rats. Asterisk (\*) indicates Fe-treated rats are significantly different from saline treated rats ( $p < 0.05$ ).



**Figure 5.** The concentration of Fe in serum(A) and liver(B) after intratracheal instillation with Fe in FeS-diet or FeD-diet fed rats. Asterisk (\*) indicates Fe treated rats are significantly different from saline treated rats ( $p < 0.05$ ).

## 고찰

이번 연구에서 랫트에게 Fe 정상 또는 결핍 식이를 4주간 공급한 결과 Fe 결핍식이군에서는 Fe 정상식이를 공급한 실험동물에 비해 체중 증가의 감소, 체내 Fe 수준의 감소와 UIBC 증가 및 저색소성 소적혈구의 철 결핍성 빈혈 소견을 나타내었다. 이는 Fe 결핍식이로 인하여 실험동물에서 Fe 결핍모델이 구축되었음을 알 수 있다. 또한 폐와 간조직내 Fe 농도는 Fe 결핍식이군에서 각각  $47.4 \mu\text{g/g}$  wet weight,  $29.7 \mu\text{g/g}$  wet weight로서 Fe 정상식이군의 폐  $71.3 \mu\text{g/g}$  wet weight, 간  $112.8 \mu\text{g/g}$  wet weight에 비해 낮게 나타났다. 폐조직에서의 DMT1과

MTP1 mRNA 발현은 Fe 결핍식이군에서 Fe 정상식이군에 비해 증가되는 것으로 관찰 되었다. 이러한 결과는 in vitro 와 in vivo 실험에서 Fe 결핍을 유발하였을 때 십이지장에서 DMT1과 MTP1의 발현이 증가한다는 여러 연구자들의 보고와 비슷한 연구결과이다 [15-19].

Fe 결핍식이를 공급하였을 때 Fe 이동 단백질로 알려진 DMT1과 MTP1 mRNA 발현의 증가는 체내 Fe의 항상성을 유지하기 위한 기전으로 설명되고 있다. DMT1은 두 종류 즉, DMT1(iron response element ; IRE)와 DMT1(non-IRE)가 있는데 이중 DMT1(IRE)이 십이지장에서 Fe 결핍에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다 [20-22].

이때 DMT1과 MTP1 mRNA의 증가는 mRNA에 있는 IRE(DMT1- 3' IRE, MTP1- 5' IRE)와 세포질에 있는 IRP(iron regulatory protein)의 상호작용을 통해 일어난다 [23]. 즉, Fe 결핍식이의 공급으로 인해 실험동물의 체내 Fe의 결핍상태가 초래됨으로써 혈중 Fe의 수준이 감소된다. 소장상피세포의 기저부에서 혈중 Fe의 수준을 통하여 체내 Fe의 부족 상태를 인지하여 장내 Fe의 흡수를 높임으로서 Fe의 항상성을 유지하기 위하여 소장에서 DMT1의 발현이 증가되는 것으로 이해되고 있다 [14]. 이번 연구에서 폐조직내 Fe 수준이 낮은 상태에서 DMT1 mRNA의 발현이 증가된 것은 폐에서의 Fe 수준을 유지하기 위하여 체내 순환 Fe를 폐로 이동을 증가시키기 위한 것으로 일부 해석할 수 있으나 MTP1 발현의 증가에 대해서는 좀 더 연구되어야 할 것으로 사료된다. Yang 등 [24]에 의하면 MTP1은 포유동물에서 Fe를 배출하는 역할을 하는 단백질로서 Mouse에서 간과 십이지장 등에서 발현되며, Fe 결핍을 유발하였을 때 소장상피세포의 기저부에 위치한 MTP1의 발현이 증가하여 장관으로부터 흡수한 Fe를 소장상피세포로부터 혈액으로 이동하는 역할을 하는 것으로 이해되고 있다. 그러나 Fe결핍에 의해 간에서의 MTP1 발현은 증가되지 않은 것으로 보고 되어 있다. 이는 금속 이동 단백질의 역할이 장기마다 다를 수 있음을 시사하는 자료로서 추후 Fe 결핍식이군에서 각 장기별로 금속 이동 단백질의 발현 수준에 대한 관찰이 필요하리라 생각된다.

실험동물의 기관내로 Fe를 노출 후 폐조직에서의 Fe 농도는 Fe 정상식이군과 결핍식이군 모두에서 노출량에 따라 양-반응적으로 증가되어 실험동물 체중 kg당 Fe 10 mg 투여군에서부터 saline 투여군에 비해 높은 것으로 관찰되었다. 형태학적 소견에서도 saline을 투여한 Fe 정상식이군과 Fe 결핍식이군의 폐조직은 정상적인 형태의 폐포와 간질이 유지되었고, Fe 10 mg/kg 투여군에서는 두 군 모두에서 경도에서 중등도의 부종과 염증 그리고 최소한의 폐포 구조 손상이 관찰되었다. Fe 20 mg/kg 투여군에서는 부종과 염증 및 폐포 구조

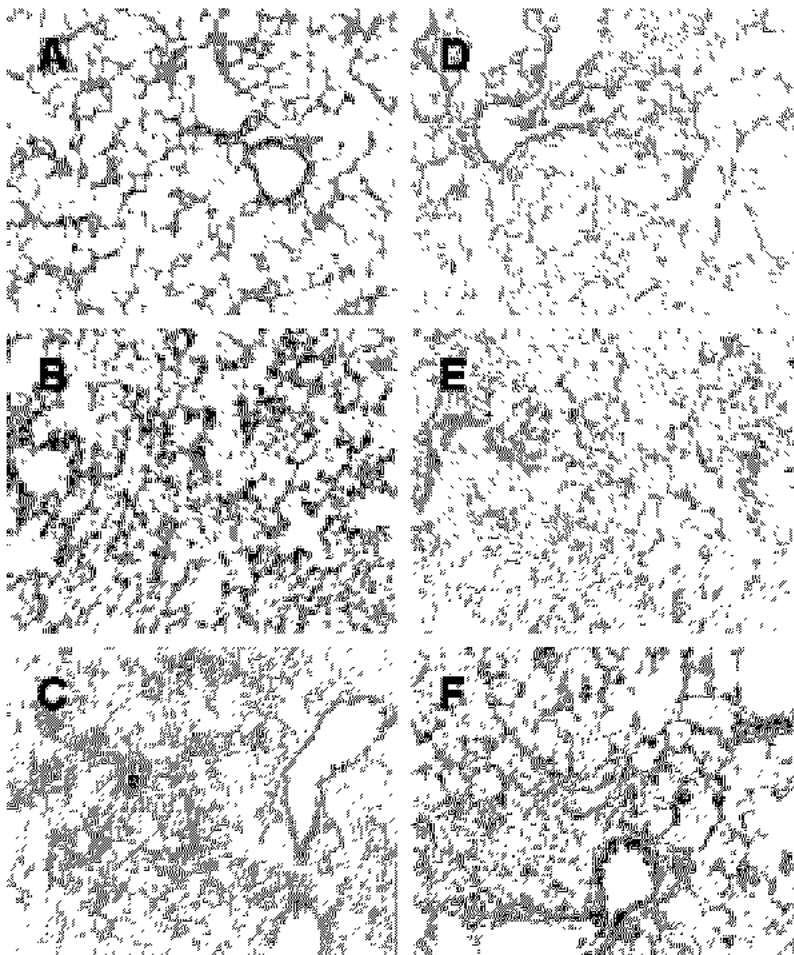


Figure 6. Histopathological findings in lung at 24 hours after single administration of iron intratracheal instillation with various doses into rats. (A-C, FeS diet fed, A: saline, B: 10 mg Fe/kg body weight, C: 20 mg Fe/kg body weight, D-E, FeD diet fed, D: saline, E: 10 mg Fe/kg body weight, F: 20 mg Fe/kg body weight)

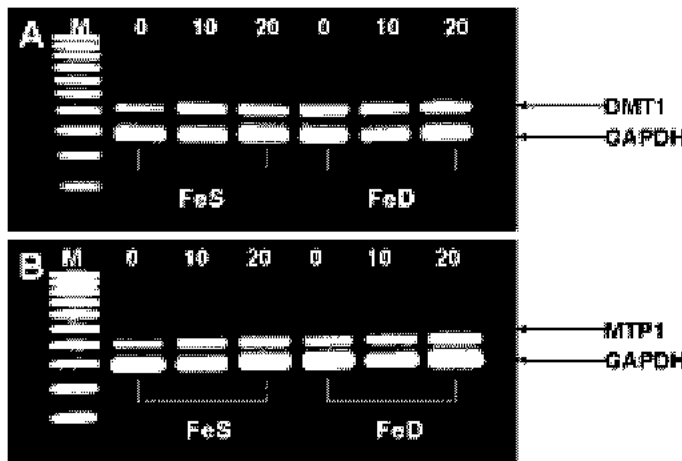


Figure 7. Expression level of DMT1 and MTP1 mRNA in lung of FeS-diet or FeD-diet fed rats. DMT1 and MTP1 mRNA was analyzed by RT-PCR, and band density was compared to GAPDH (A: upper panel, DMT1 mRNA expression, B: lower panel, MTP1 mRNA expression, M: DNA marker, 0: saline, 10: 10 mg Fe/kg body weight, 20: 20 mg Fe/kg body weight).

의 파괴가 10 mg/kg 군에 비해 더욱 심해진 것으로 관찰되었다. 즉, 기관내 Fe 노출 후 폐조직에서의 Fe 농도와 형태학적 소견에서는 Fe 노출량에 따른 폐조직내 Fe 농도

의 양-반응적 증가와 조직 손상이 관찰되었다. 그러나 혈청과 간장에서의 Fe 농도는 Fe 10 mg/kg을 기관지내로 투여하였을 때 Fe 정상식이 또는 Fe 결핍식이 두 군 모

두에서 saline 투여군과 비슷한 수준이었고, Fe 20 mg/kg을 투여한 군에서는 Fe 정상식이군과 Fe 결핍식이군 모두에서 saline 투여군에 비해 높은 것으로 관찰되었다. 이러한 연구결과 즉, 기관지내로 10 mg/kg의 Fe에 노출된 경우 폐조직내 Fe 농도는 노출량에 따라 증가되었으나, 혈청과 간장내 Fe 농도는 대조군과 비슷한 수준으로 관찰된 것은 실험동물 체중 kg당 10 mg의 Fe 노출에 의해 폐에서의 Fe 농도가 증가되고 이로 인해 폐조직의 형태학적 변화가 일부 초래되었으나 혈액을 통한 체내로의 흡수는 제한되는 것으로 추정된다. 그러나 실험동물의 체중 kg당 20 mg의 Fe 노출에서는 폐조직의 과도한 손상이 초래됨으로서 폐조직내 Fe가 혈액을 통해 체내로 이동되는 것으로 사료된다.

이번 연구에서 Fe를 기관지내로 노출 후 폐조직에서 금속이동단백질의 발현정도를 mRNA 수준에서 관찰한 결과, DMT1 mRNA의 발현이 Fe 정상식이군에서는 실험동물 체중 kg당 Fe 10 mg과 20 mg 투여군 모두에서 saline 투여군에 비해 높았으나 Fe 결핍식이군에서는 Fe 10 mg 투여군에서 saline군에 비해 약 11% 증가되었고 Fe 20 mg 투여군에서는 비슷한 수준으로 관찰되었다. 실험동물의 폐조직내 MTP1 mRNA는 Fe 10 또는 20 mg/kg 투여군에서 Fe 정상식이군과 결핍식이군 모두에서 saline군에 비해 높은 수준으로 관찰되었다. Fe 과다 노출 환경에서 DMT1과 MTP1의 발현에 대한 최근 연구 결과를 보면, Yang 등 [25]의 in vitro 연구에서 MTP1이 과다 발현된 세포의 경우 세포내 Fe 농도가 감소되는 것으로 관찰되었다. 또한 사람과 설치류의 폐포세포를 대상으로 Fe를 주입한 경우 MTP1의 발현이 증가하였고, 사람의 alveolar macrophages에 ferric ammonium citrate를 농도별로 처리하여 western blot방법으로 관찰한 연구에서 Fe 농도가 높을수록 MTP1 발현이 증가한 것으로 보고된 바 있다. 이와 비슷한 양상으로 BEAS-2B 세포에 ferric ammonium citrate를 24시간 동안 노출한 후 quantitative PCR 방법으로 관찰한 연구에서 Fe의 농도가 높을수록 DMT1의 발현이 증가하였다 [26]. 이러한 연구·

보고들은 폐에서 과도하게 노출된 Fe에 의한 독성에 대한 방어기전으로 DMT1과 MTP1의 발현이 증가됨을 시사한다 [25,26]. Ghio 등 [4]의 연구에서도 폐세포에서 과량의 Fe에 노출되었을 때 DMT1과 MTP1의 발현이 증가됨을 보고하였으나 그 역할에 대해서는 아직까지 완전히 이해되고 있지 않은 상태이다. 폐조직에서 과잉 노출된 Fe는 반응성이 강한 금속이온으로서 free radical 생성을 유발하여 oxidative stress에 의한 조직 손상을 주는 것으로 알려져 있다 [1]. 이번 연구의 Fe 과다 노출 환경에서 폐조직내 DMT1과 MTP1의 발현이 saline 투여군에 비해 증가된 것은 Fe 결핍식 소장에서의 DMT1과 MTP1의 역할과는 달리 과잉의 Fe에 의한 독성 작용에 대한 방어적인 작용으로 폐에서 그 발현이 증가된 것으로 일부 이해되고 있다 [25,26]. 그러나 이번 연구의 Fe 과다 노출 환경에서 실험동물의 체내 Fe 수준에 따른 폐조직에서의 DMT1과 MTP1 발현 양상을 비교해 볼 때, Fe 결핍식이군에서 saline 투여에 비해 DMT1과 MTP1 발현의 증가정도가 Fe 정상식이군에 비해 상대적으로 낮은 것으로 관찰되었다. 이는 전술한 바와 같이 Fe 결핍식이군에서 식이에 의해 초래된 Fe 결핍으로 인해 폐조직에서 금속이동단백질의 높은 수준에서의 발현 유지가 한 요인으로 작용하였으리라 추정된다. 그러나 아직까지 Fe와 같은 금속이온의 결핍과 과잉상태에서 폐에서의 금속이동단백질의 발현과 그 역할에 대해서는 좀 더 연구되어야 할 과제로 생각한다. 이번 연구로 볼 때 폐에서의 DMT1과 MTP1 역할의 일부가 체내 Fe의 주 조절장기인 소장에서의 역할과는 다를 수 있을 것으로 사료되므로, 포유동물의 대부분 장기에 분포하는 DMT1과 MTP1의 조직 각 분포 영역에서의 그 기능과 역할에 대한 보다 구체적인 연구가 필요하리라 생각한다.

**요약 및 결론**

철(Fe)은 생체물질대사에 필수적인 금속이온이지만 체내에서 과다하게 Fe에

노출되는 경우 여러 가지 건강장애를 나타낸다. 대기오염 물질 중에는 비교적 많은 량의 Fe가 함유되어 있어 대기오염으로 인한 호흡기계를 통해서도 과량의 Fe에 노출될 수 있을 것으로 사료된다. 이번 연구에서는 실험동물의 기관지내로 Fe를 노출시킨 후 폐조직에서 DMT1과 MTP1의 발현정도 및 폐와 간장에서의 Fe 농도를 비교하여 폐에서 금속 이동 단백질의 역할을 알아보고자 하였다. Fe 결핍 실험 동물 모델은 Fe 결핍식을 이용하여 만들었다. Fe 결핍식을 공급한 실험동물에서 혈청 sFe의 감소, UIBC 증가 및 저색소성 소적혈구가 관찰되어 Fe 결핍소견을 나타내었다. 실험동물의 폐와 간장내 Fe 농도는 Fe 결핍식이군에서 정상식이군에 비해 낮았고, 폐조직내 금속 이동 단백질(DMT1과 MTP1)의 발현정도는 Fe 결핍군에서 정상군에 비해 높은 것으로 관찰되었다. Fe 노출 후 폐조직내 Fe 농도는 Fe 노출량에 따라 양-반응적으로 증가되었으나, 간과 혈청내 Fe 농도는 저농도 Fe 노출에서는 증가되지 않은 것으로 관찰되었다. Fe 결핍 또는 정상군 모두에서 기관지내로 Fe 노출 후 폐장내 DMT1과 MTP1의 발현이 증가되는 것으로 관찰되었다. 요약하면, Fe 결핍식에 의해 체내 철 결핍이 초래되었고, 실험동물의 폐조직내 DMT1과 MTP1은 Fe 결핍군에서 정상군에 비해 높은 수준으로 발현되었다. 기관지내로 Fe 화합물을 노출시켰을 때 정상군과 Fe 결핍군 모두에서 폐조직내 DMT1과 MTP1의 발현이 증가되었고 폐조직내 Fe 농도는 양-반응적으로 증가되었으나 간과 혈청내 Fe 농도는 저농도 Fe 노출에서는 증가되지 않았다. 이러한 결과는 호흡기를 통해 과량의 Fe에 노출 되었을 때 폐에서의 DMT1과 MTP1 역할 중 일부는 체내 Fe의 주 조절장기인 소장에서와는 다를 수 있음을 시사한다.

**참고문헌**

1. Reid D, Snell G, Ward C, Krishnaswamy R, Ward R, Zheng L, Williams T, Walters. Iron overload and nitric oxide-derived oxidative stress following lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20:840-849

2. Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM. Iron and the redox status of the lungs. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:1306-1313

3. Sung J, Cho SH, Kang D, Yoo. KY. Lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease and air pollution. *Korean J Prev Med* 1997; 30 (3): 585-598 (Korean)

4. Ghio AJ, Richards JH, Carter ID, Madden MC. Accumulation of iron in the rat lung after tracheal instillation of diesel particles. *Toxicol Pathol* 2000; 28: 619-627

5. Umbreit JN, Conrad ME, Moore EG, Desai MP, Turens J. Paraferritin: a protein complex with ferrireductase activity is associated with iron absorption in rats. *Biochemistry* 1996; 35: 6460-6469

6. Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cell. *Biochim Biophys Acta* 1997; 14:140

7. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388: 482-488

8. Flennig MD, Trenor CC, 3rd, Su MA, Foemzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 1997; 16: 383-386

9. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2000; 275: 19906-19912

10. Georgieff MK, Wobken JK, Welle J, Burdo JR, Connor JR. Identification and localization of divalent metal transporter-1 (DMT-1) in term human placenta. *Placenta* 2000; 21: 799-804

11. Oates PS, Trinder D, Morgan EH. Gastrointestinal function, divalent metal transporter-1 expression and intestinal iron absorption. *Pflugers Arch* 2000; 440: 496-502

12. Yeh KY, Yeh M, Watkins JA, Rodriguez-Paris J, Glass J. Dietary iron induces rapid changes in rat intestinal divalent metal transporter expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: 1070-1079

13. Burdo JR, Menzies SL, Simpson IA, Garrick LM, Garrick MD, Dolan KG, Haile DJ, Beard JL, Connor JR. Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res* 2001; 66: 1198-1207

14. Zoller H, Koch RO, Theurl I, Obrist P, Pietrangelo A, Montosi G, Haile DJ, Vogel W, Weiss G. Expression of the duodenal iron

- transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology* 2001; 120: 1412-1419
15. Garbling L, Danzeisen R, Gair S, Lea RG, Charania Z, Solanky N, Joory KD, Strai SK, McArdle HJ. Effect of iron deficiency on placental transfer of iron and expression of iron transport proteins in vivo and in vitro. *Biochem J* 2001; 15: 883-889
  16. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulpe CD, McKie AT, Trinder D, Anderson GJ. Hcpidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 835-844
  17. Chen H, Su T, Attieh ZK, Fox TC, McKie AT, Anderson GJ, Vulpe CD. Systemic regulation of Hephaestin and Ireg1 revealed in studies of genetic and nutritional iron deficiency. *Blood* 2003; 102: 1893-1899
  18. Muckenthaler M, Roy CN, Custodio AO, Minana B, deGraaf J, Montross LK, Andrews NC, Hentze MW. Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and Cybrd1 expression in mouse hemochromatosis. *Nat Genet* 2003; 34: 102-107
  19. Stuart KA, Anderson GJ, Frazer DM, Powell LW, McCullen M, Fletcher LM, Crawford DH. Duodenal expression of iron transport molecules in untreated haemochromatosis subjects. *Gut* 2003; 52: 953-959
  20. Fleming RE, Migas MC, Zhou X, Jiang J, Britton RS, Brunt EM, Tomatsu S, Waheed A, Bacon BR, Sly WS. Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3143-3148
  21. Picard V, Govoni G, Jabado N, Gros P. Nramp 2 (DCT1/DMT1) expressed at the plasma membrane transports iron and other divalent cations into a calcein-accessible cytoplasmic pool. *J Biol Chem* 2000; 275: 35738-35745
  22. Strai SK, Bomford A, McArdle HJ. Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15: 243-259
  23. Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S, Takeda S. Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588: 195-202
  24. Yang F, Liu XB, Quinones M, Melby PC, Ghio A, Haile DJ. Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *J Biol Chem* 2002a; 277: 39786-39791
  25. Yang F, Wang X, Haile DJ, Piantadosi CA, Ghio AJ. Iron increases expression of iron-export protein MTP1 in lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002b; 283: 932-939
  26. Wang X, Ghio AJ, Yang F, Dolan KG, Garrick MD, Piantadosi CA. Iron uptake and Nramp2/DMT1/DCT1 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: 987-995