

결정형 규산분진에 의한 A549 세포의 독성 및 섬유모세포 증식에 Desferrioxamine이 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 성모병원 산업의학과

김경아 · 김은경 · 김지홍 · 임 영

— Abstract —

Effect of Desferrioxamine on Silica-Induced Cytotoxicity of A549 and Fibroblast Proliferation

Kyoung-Ah Kim, Eun-Kyung Kim, Ji-Hong Kim, Young Lim

*Department of Occupational and Environmental Medicine, Institute of Industrial Medicine,
St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea*

The inhalation of crystalline silica results in the production of reactive oxygen species(ROS). Among these ROS, hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$) is believed to be the most reactive one. $\cdot\text{OH}$ is generated in reaction between superoxide and hydrogen peroxide catalyzed by transition metal, especially iron. Therefore iron should be important in the bioactivity of crystalline silica. Desferrioxamine, a iron chelator, may be protective in silica-induced pulmonary reaction.

To test this assumption we investigated the protective effect of desferrioxamine on lipid peroxidation of cell membrane, cytotoxicity, production of proinflammatory and chemotactic cytokine and fibroblast proliferation by crystalline silica in vitro model.

The results were as follows:

1. Fenton activity of silica and asbestos was significantly higher than that of control. Fenton activity in crocidolite was higher than silica at the same dose. This result correlated with iron content of dust. Fenton activity of silica and crocidolite was decreased by preincubation of silica with desferrioxamine.
2. Silica induced a dose-dependent increase of MDA concentration in lung epithelial cell lysate dose dependently. Marked decrease of MDA was observed in desferrioxamine-treated silica group compared with untreated group.
3. As concentration of stimulated silica, silica-induced cytotoxicity was increased. There was significant decrease of cytotoxicity in desferrioxamine-treated silica group compared with untreated group.

4. α -quartz augmented the production of TNF- α and IL-8 from A549 cell. While desferrioxamine suppressed the release of cytokines.
5. Supernatant of silica-cocultured A549 cell induced a significant proliferation of fibroblast, which desferrioxamine blocked this proliferation.

From these result, we concluded that desferrioxamine has a protective effect on silica induced pulmonary reaction.

서 론

분진이 폐장내로 흡입되었을 때 세포파괴가 일어나며 이것이 염증 및 폐섬유화 반응등 일련의 조직반응을 일으키는 시발점이 된다. 분진에 의한 세포 파괴는 대부분 활성화된 염증세포로부터 분비되거나 분진 표면으로부터 유리되는 반응성 산소기에 의하여 이루어진다(Kamp등, 1992; Vallyathan등, 1992; Schapira등, 1994). 결정형 규산분진을 탐식한 세포로부터 초과산화이온과 과산화수소가 일차적으로 분비되거나 결정형 규산분진의 세포독성은 이들 산소기보다는 산소기들 간의 반응에 의하여 이차적으로 생산되는 hydroxyl radical(\cdot OH)과 직접적인 관계가 있다고 알려져있다(Burtler와 Halliwell, 1982). \cdot OH 생산 능력이 분진에 따라 차이가 있으며 \cdot OH 생성능력이 클수록 DNA손상이 크고 섬유화정도 크다(Halliwell와 Gutteridge, 1986). 초과산화이온과 과산화수소의 반응에 의하여 \cdot OH이 생성될때 철과 같은 전환금속(transition metal)이 Fenton catalysts로 작용하여 \cdot OH 생성을 촉진한다(Halliwell과 Gutteridge, 1986; Schapira등 1995). 따라서 분진의 생물학적인 활성도는 분진에 함유되어 있거나 생체내에서 유리되는 철과 밀접한 관계가 있다고 할 수 있다.

진폐증의 진행과정에서 산소기의 역할은 크게 두 가지를 들 수 있다. 지금까지 기술한 세포독성효과 이외에 다른 한가지는 세포 활성화이다. 산소기는 cytokine의 생성을 유발하는 세포내 신호전달계에 작용하여 세포로부터 분비되는 매개물질의 생산을 촉진하여 분진에 의한 염증 및 섬유화 반응을 자극 또는 유지 시키는데 관여한다(윤임중, 1998). 따라서 산소기 또는 특이적으로 \cdot OH의 활동을 억제시킴으로써 결정형 규산분진에 의한 세포 및 조직파괴 그리고 더 나아가 폐포염이나 간질의 섬유화와 같은 폐의 병리적 반응을 막을수 있을 것이다.

Desferrioxamine은 철 착화제로 철과 복합체를 이루어 \cdot OH 생산을 억제할수 있다(Halliwell과 Gutteridge, 1986). 그러므로 desferrioxamine은 결정형 규산분진에 의한 세포파괴나 섬유화반응으로부터 폐장을 보호하는 효과 더 나아가 치료효과를 가질수 있을 것으로 생각되었다.

폐장의 구조 및 기능을 유지하기 위하여는 상피조직의 연속성을 유지해야만한다. 분진자체의 세포독성 효과나 탐식세포와의 반응에 의하여 유리되는 산소기들에 의하여 상피세포 장벽(epithelial barrier)이 파괴되며 이것이 진폐증으로 진행되는 데 중요한 촉발인자라고 생각되고 있다. 상피세포의 연속성 파괴정도와 염증 및 섬유화와 같은 폐조직변화의 중등도와는 밀접한 관련성이 증명되어 있다(Donaldson, 1998). 상피세포는 또한 분진과 반응하여 여러 가지 매개물질을 분비하여 염증 및 섬유화 반응을 조절하므로 분진에 의한 세포독성이나 세포 활성화에 의한 매개물질의 분비능을 조사하고자 할 때 적절한 목표 세포(target cell)로 생각되고 있다.

따라서 분진을 desferrioxamine으로 처리하여 분진의 철을 제거하였을 때 분진이 Fenton catalysts으로 작용하는 능력이 어떻게 변화하는지 알아보았다. 또한 실험관내에서 desferrioxamine이 결정형 규산분진으로 자극한 폐상피세포의 세포독성 및 매개물질의 분비능력에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 그리고 폐상피세포의 배양 상층액이 섬유모세포의 증식에 미치는 영향을 살펴본다 desferrioxamine이 결정형 규산분진에 의한 폐조직반응에 방어효과가 있는지 in vitro 모델을 만들어 알아보았다.

연구대상 및 방법

1. 분진

1) 결정형 규산분진

결정형 규산분진으로 α -quartz(Min-U-Sil, U. S. Silicacompany, Towson, ML)를 이용하였다.

2) Crocidolite

분진의 fenton activity 측정시 양성 대조군으로 철의 함량이 높은 crocidolite를 이용하였다. crocidolite는 日本作業環境測定協會에서 표준화한 시료를 이용하였다.

실험에 사용하기전 분진에 함유되어 있을 수 있는 내독소를 제거하기 위하여 고압멸균(autoclave) 하였으며 세포와 반응시킬때에는 배지에 섞어 2시간 동안 초음파 처리 후 사용하였다.

2. 분진의 desferrioxamine 처리

분진에 함유된 철을 제거하기 위하여 분진을 25 mM의 desferrioxamine(Sigma, St. Louis, MO) 용액에 37℃에서 72시간 동안 처리한 후 인산완충액으로 3번 그리고 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Sigma, St. Louis, MO)으로 3번 세척하였다. 마지막으로 DMEM으로 분진의 농도가 10 mg/ml가 되도록 맞추었다. Desferrioxamine을 포함하지 않은 증류수에 같은 조건으로 분진을 처리하여 철을 제거하지 않은 대조분진으로 이용하였다.

3. 분진의 Fenton activity 측정

Desferrioxamine으로 처리하였을 때 분진의 산소기 생성 능력의 변화를 알아보고자 분진의 fenton catalyst으로 작용능을 deoxyribose를 검출물질(detector material)로 하여 측정하였다. 유리실험관에 deoxyribose 1.0 mM, 과산화수소 1.0 mM, ascorbate 1.0 mM, 그리고 500 µg의 α-quartz, crocidolite 그리고 desferrioxamine으로 처리한 분진을 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1,200 g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리한 후 상층액 1 ml를 주의깊게 채취하여 1.0 % thiobarbituric acid (TBA, Sigma, St. Louis, MO) 1 ml와 2.8 % trichloroacetic acid(TCA, Sigma, St. Louis, MO) 1 ml를 넣고 100℃에서 10분간 반응시킨 후 얼음속에 넣어 냉각 시켰다. Spectrophotometer 로 532 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료는 5배수로 준비하여 측정하였다.

4. 세포배양

사람의 폐상피세포암에서 분리된 폐상피세포주인

A549(ATCC CCL 185, Rockvill, MD)세포를 α-quartz에 의한 세포독성, 지질과산화, 그리고 세포로부터 cytokine 생산능 측정에 이용하였다.

섬유모세포로는 정상 쥐(fischer)에서 분리된 섬유모세포 세포주인 Rat2(ATCC ARL-1764, Rockvill, MD)가 이용되었다. 두세포주 모두 10 % fetal calf serum(FCS, Sigma, St. Louis, MO)이 포함된 DMEM을 배지로 이용하여 개대배양하였다.

5. 폐상피세포의 지질과산화 측정

cytokine을 측정하기 위하여 상층액을 거둔 뒤 남아있는 세포를 PBS로 세척하였다. 각 well에 3차중류수 400 µl를 가하고 얼렸다 녹이는 것을 반복하여 세포를 용해 시켰다. 용해된 세포액을 원심분리한 후 상층액에서 malondialdehyde(MDA)를 측정함으로써 지질과산화 정도를 정량하였다. 세포 용해 상층액에 300 µl에 1 % TBA 300 µl 그리고 2.8 % TCA 300 µl를 가하고 100℃에서 10분간 반응시킨 후 즉시 얼음속에 넣었다. 532 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선에 의하여 MDA 농도를 계산하였다.

6. 폐상피세포의 세포독성 측정

96 well plate에 A549세포를 well당 1×10^4 개가 되도록 분주하고 24시간 배양한 후 2회 세척하였다. desferrioxamine으로 처리하였거나 처리하지 않은 분진 이 포함된 배지로 갈아주고 24시간 동안 다시 배양하였다. 이때 분진의 농도는 1, 10, 그리고 100 µg/cm²로 하였다. 100 % 세포독성의 지표(A100)는 배지에 0.05 % triton-X가 포함되도록 하여 그리고 0 % 세포독성의 지표(A0)는 배지만을 넣어서 배양한 군으로 하여 세포독성을 환산하였다. 반응이 끝난 후 phosphate buffered saline(PBS, Sigma, St. Louis, MO)로 세척하고 0.006 % neutral red가 포함된 phenol red가 없는 배지로 갈아준 뒤 75분간 배양하였다. 배양이 끝난후 PBS로 다시 세척하고 30 % ethanol에 0.01 N HCl이 포함되도록 한 용출액을 가한후 550 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 아래와 같은 식으로 환산하였다.

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{A0 - As}{A0 - A100} \times 100$$

7. 폐상피세포의 cytokine 생성능

A549세포를 6well plate에 분주하고 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 세포가 well의 90 % 정도 차기를 기다렸다가 1 % FCS가 포함된 배지로 갈아 주고 48시간 동안 더 배양하였다. 48시간 후 세포를 배지로 세척한 후 분진을 농도별로 분주하였다. Desferrioxamine이 처리군은 분진 처리시 1 mM의 desferrioxamine을 같이 처리하여 α -quartz만을 처리한 군과 비교하였다. 분진을 처리하고 24시간 더 배양한 후 상층액을 거두어 10,000 rpm에 10분간 원심분리한 후 분진을 제거한 상층액을 거두어 cytokine 측정시 까지 -70°C 에서 보관하였다. 배양판에 남아 있는 세포는 지질과산화를 측정하는데 이용하였다.

폐상피세포를 결정형 규산분진으로 자극하였을 때 폐상피세포로부터 염증 및 섬유화 반응에 관여하는 여러가지 cytokine의 분비를 촉진시킬 것으로 생각되고 있다. 본 연구에서는 cytokine network에서 염증반응전 분비되어 염증세포의 침윤을 직접 유도하는 chemokine을 자극하는 역할을 하는 proinflammatory cytokine 중 하나인 $\text{TNF}\alpha$ 와 chemokine 중에서 IL-8를 측정하였다. 모든 cytokine은 ELISA방법으로 측정하였으며 사람의 cytokine 표준시료를 이용하여 표준곡선을 구하였으며 이를 이용하여 각시료의 cytokine 농도를 환산하였다.

8. 섬유모세포 증식측정

96-well plate에 Rat2 cell를 well당 1×10^4 개가 되도록 분주하고 24시간 배양하였다. 24시간 후 0.1 % FCS가 포함된 배지로 갈아주고 48시간동안 배양하여 생존율에 변화는 없으나 증식은 억제된 상태 (noncycling fibroblast)로 유지시켰다. 48시간후 세포를 DMEM으로 세척한 후 상피세포 배양 상층액으로 바꾸어 주고 24, 48, 그리고 72시간 후 상피세포의 세포독성 측정시 사용하였던 neutral red 방법으로 살아있는 세포의 수를 정량하였다.

9. 통계학적 검정

모든 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 두 군간의 차이는 Wilcoxon rank sum test로 검정하였고, 시간에 따른 변화나 분진 농도에 따른 변화의

경향은 GLM의 trend test로 검정하였다.

연구결과

1. Desferrioxamine이 분진의 Fenton activity에 미치는 영향

α -quartz와 crocidolite는 PBS대조군에 비하여 fenton activity가 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). crocidolite가 α -quartz에 비하여 fenton activity가 현저하게 증가되어 있었다. crocidolite가 철의 함량이 높은 분진이기 때문으로 생각되었다. 두분진 모두 desferrioxamine으로 처리한 경우처리하지 않았을 때에 비하여 fenton activity가 유의하게 감소하였으며($p < 0.05$) α -quartz는 20 % 그리고 crocidolite는 50%정도 감소하였다(Fig. 1).

2. α -quartz에 의한 폐상피세포의 지질과산화에 desferrioxamine이 미치는 영향

폐상피세포 세포막의 지질과산화는 세포를 용해시킨후 그 용해질내의 MDA양를 측정함으로써 정량하였다. 규산분진이 포함되지 않은 배지만 넣어준 대조군의 경우 $0.91 \pm 0.11 \text{ nM/ml}$ 이었는데 $5 \mu\text{g/cm}^2$ 또는 $50 \mu\text{g/cm}^2$ 의 결정형 규산분진으로 세포를 자극한 경우 각각 $12.23 \pm 3.10 \text{ nM/ml}$ 와 $20.92 \pm 6.71 \text{ nM/ml}$ 로 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 자극하는

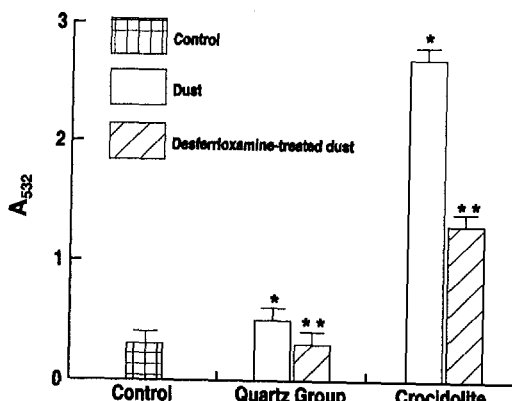


Fig. 1. Changes of fenton activity of dust by desferrioxamine.

* : denoted a significant difference from control at $p < 0.05$

** : denoted a significant difference from desferrioxamine non-treated quart at $p < 0.05$

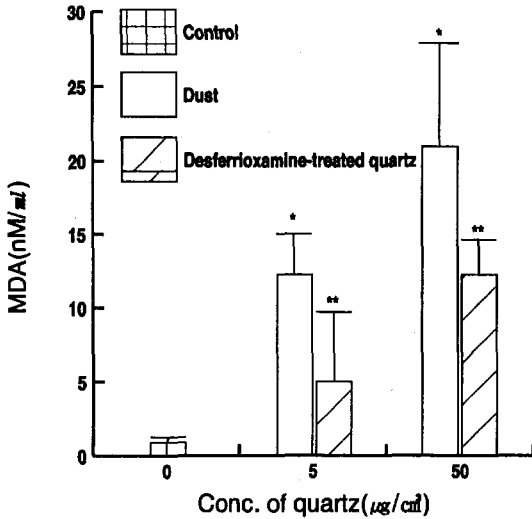


Fig. 2. Effect of desferrioxamine on lipid peroxidation of A549 cell by α -quartz
 * : denoted a significant difference from control at $p < 0.05$
 ** : denoted a significant difference from desferrioxamine non-treated α -quartz at $p < 0.05$

구산분진의 농도가 같을 때 desferrioxamine으로 처리하면 처리하지 않은 군에 비하여 MDA의 양이 유의하게 감소하였다(Fig. 2, $P < 0.05$).

3. α -quartz에 의한 폐상피세포의 세포독성에 desferrioxamine이 미치는 영향

Fig. 3에 보는 바와 같이 세포를 자극한 α -quartz의 농도가 증가할수록 세포독성도 증가하는 양-반응 관계를 보였다. α -quartz의 농도가 10과 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 일때, Desferrioxamine으로 처리하는 경우 폐상피세포의 세포독성은 처리하지 않았을 때에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

4. α -quartz로 자극한 폐상피세포의 cytokine 생성능에 desferrioxamine이 미치는 영향

4-1. $\text{TNF}\alpha$

결정형 구산분진의 농도가 증가할수록 배양상층액 내 $\text{TNF}\alpha$ 의 농도도 증가하는 양상을 보였으며 결정형 구산분진의 농도가 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 일 때 $498.77 \pm 47.65 \text{ ng/ml}$ 으로 대조군 $254.07 \pm 34.74 \text{ ng/ml}$ 에 비하여 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 농도로 결정형 구산분진을 처리하였을 때에 비하여

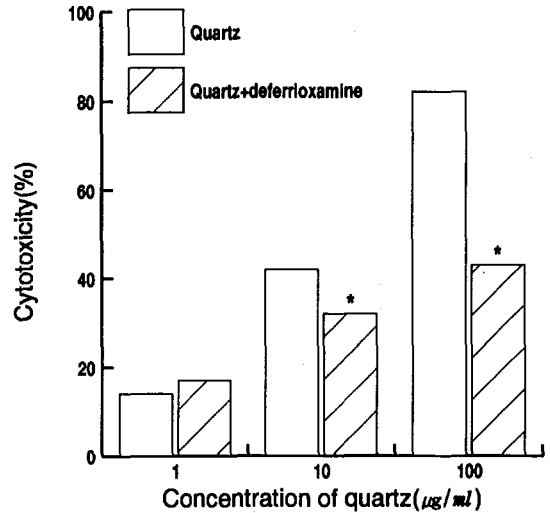


Fig. 3. Effect of desferrioxamine on cytotoxicity of A549 cell by α -quartz.
 * : significant difference from the α -quartz group at $p < 0.05$

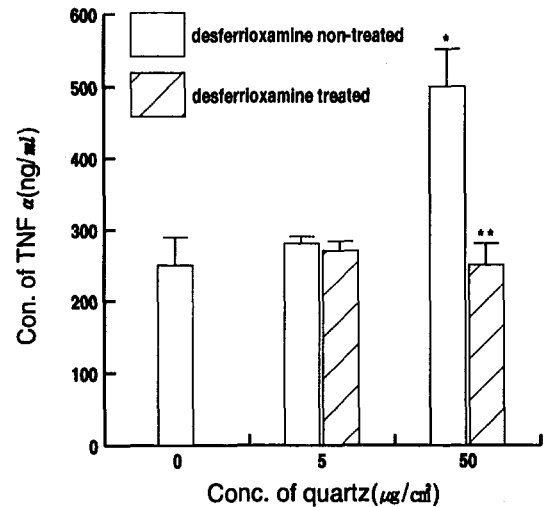


Fig. 4. Effect of desferrioxamine on production of $\text{TNF}\alpha$ from A549 cell stimulated with α -quartz
 * : denoted a significant difference from control at $p < 0.05$
 ** : denoted a significant difference from desferrioxamine non-treated α -quartz at $p < 0.05$

같은 조건에서 desferrioxamine을 동시에 처리하였을 때 상층액내 $\text{TNF}\alpha$ 농도가 $256.81 \pm 36.01 \text{ ng/ml}$ 로 유의하게 감소하였다(Fig. 4, $p < 0.05$).

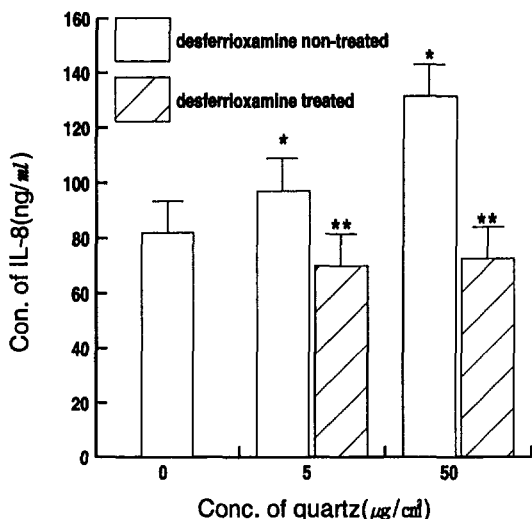


Fig. 5. Effect of desferrioxamine on production of IL-8 from A549 cell, stimulated with α -quartz

* : denoted a significant difference from control at $p < 0.05$

** : denoted a significant difference from desferrioxamine non-treated α -quartz at $p < 0.05$

4-2. IL-8

결정형 규산분진에 의한 폐상피세포의 IL-8 생성능의 변화는 대조군의 $81.99 \pm 8.79 \text{ ng/ml}$ 에 비하여 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 자극군이 $97.13 \pm 8.24 \text{ ng/ml}$, 그리고 $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 자극군은 $131.54 \pm 7.23 \text{ ng/ml}$ 로 유의하게 증가하였다. 결정형 규산분진의 농도는 같으면서 desferrioxamine을 첨가한 경우는 5와 $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 각각 $69.89 \pm 4.94 \text{ ng/ml}$ 와 $72.52 \pm 10.79 \text{ ng/ml}$ 로 결정형 규산분진만 처리한 군에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 5).

5. 폐상피세포 배양 상층액이 섬유모세포 증식에 미치는 영향

Fig. 6은 폐상피세포를 결정형 규산분진으로 자극하고 배양한 후의 그 배양 상층액으로 섬유모세포를 배양하였을 때 섬유모세포의 증식정도를 보여준다. 섬유모세포의 증식 정도는 대조군에 대한 백분율로 표시하였는데 이실험에서 대조군은 폐상피세포의 배양 상층액을 첨가하지 않고 noncycling media인 0.5 %의 우태아 혈청이 포함된 DMEM만으로 배양하였다. 폐상피세포에 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 의 결정형 규산분진

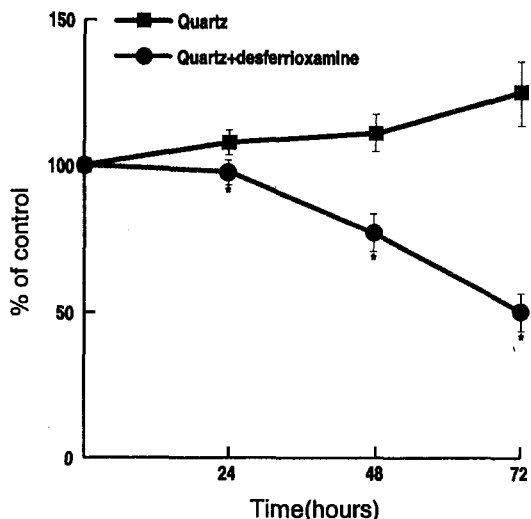


Fig. 6. Effect of desferrioxamine on fibroblast proliferation by supernatant of A549 cell stimulated with α -quartz

* : denoted a significant difference from desferrioxamine non-treated α -quartz at $p < 0.05$

으로 자극하고 24시간 배양한 상층액으로 섬유모세포를 배양하였을 때 24, 48, 그리고 72시간 배양군이 각각 $107.76 \pm 3.23 \%$, $111.03 \pm 8.25 \%$, 그리고 $125.03 \pm 4.53 \%$ 으로 점차 증식이 증가하였으나 ($p < 0.05$), 같은 조건에서 desferrioxamine으로 같이 처리하였을 때는 72시간 동안 배양하면서 24시간마다 증식율을 관찰하였을 때 각각 $97.91 \pm 4.88 \%$, $76.82 \pm 3.16 \%$, 그리고 $50.40 \pm 6.21 \%$ 로 점차 증식율이 감소하였으며 이는 desferrioxamine을 처리하지 않은 각각의 군에 비하여 유의하게 감소되어 있었다(Fig. 6).

고 찰

ROS에 대한 연구들은 대부분 세포막에 대한 독성 효과 및 DNA변성에 대한 연구가 대부분이다(Doelman 등, 1990; Simeonova와 Luster, 1995). ROS가 세포독성에 관여하는 반면 낮은 수준의 oxidative stress는 생리적 또는 병리적 반응에 관여하여 여러 가지 단백질의 합성을 유도할수 있다(Janssen 등, 1993). 예를 들어 ROS는 단백질의 인산화(protein phosphorylation)과 같은 신호전달계를 활성화 하는 과정에 관여한다(Larsson, 1988). 최근 여러 연구를

통하여 ROS가 NF- κ B nuclear transcriptional factor를 활성화한다는 것이 밝혀졌으며 간질성 폐질환과 같은 호흡기질환에서 염증을 매개하는 물질, 예를 들어 cytokine과 같은 유전자들의 발현과 NF- κ B가 밀접한 관련성이 있다는 보고들이 있었다(Collart, 1990; Donaldson, 1998). 특히 TNF- α 의 경우 유전자의 promotor region에 여러개의 NF- κ B binding site를 가지고 있을 것으로 추정되고 있다(Collart등, 1990). 결정형 규산분진이나 석면과 같이 섬유화성이 강한 분진들도 반응세포로부터 다량의 ROS분비를 유도하는 것으로 알려져 있는데 이들 분진에 의한 폐질환 발생과정에서도 ROS는 세포손상에 중요한 역할을 하는 한편 세포를 활성화 하여 여러 가지 매개물질들이 분비되는 과정에 관여할 것으로 생각된다.

결정형 규산분진은 반응 세포들이 ROS를 생산해 내도록 자극하는데 철은 전자를 제공하는 전환금속으로 작용하여 과산화수소와 초과산화이온의 환원을 촉진하여 반응성이 큰 ROS인 \cdot OH을 생산하는데 촉매와 같은 역할을 한다. \cdot OH는 세포손상 및 유전자 손상에 직접적인 역할을 하는 ROS로 Dalal 등(1990) 등의 연구에 의하면 철 착화제인 desferrioxamine이 물과 새롭게 분쇄시킨 석영과의 반응에 의하여 \cdot OH가 생산되는 것을 억제한다고 보고하였는데 이는 석영에 오염되어 있는 철이 fenton-유사반응에 의하여 \cdot OH의 생산을 증가시킬수 있음을 확인시킨 연구였다. 본 연구에서도 실험관내에서 결정형 규산분진이 과산화수소에서 \cdot OH을 생성시킬 수 있는 능력의 지표인 fenton activity를 측정하였던 바 결정형 규산분진에 의한 fenton activity가 철 착화제인 desferrioxamine에 의하여 유의하게 감소하였다.

Simeonova와 Luster(1995)는 desferrioxamine이 광물성 섬유에 표면에서 존재하는 ferric ion을 효과적으로 제거하여 석면의 \cdot OH 생성능을 감소시키고 석면에 의한 TNF α 의 분비도 감소시킴으로 \cdot OH이 TNF α 의 분비를 자극한다고 하였다. \cdot OH을 비롯한 ROS가 다량이 방출될 때에는 세포독성을 나타내지만 비교적 소량의 ROS에 노출되는 경우 세포 파괴 보다는 세포의 활성화에 관여할 것이라는 이론을 확인하였다.

따라서 ROS가 결정형 규산분진에 의한 조직파괴에 직접적인 역할을 하지만 폐포대식세포와 상피세

포 그리고 섬유모세포 등에서 생산되는 매개물질들 또한 규폐증의 발생에 중요한 인자이며 ROS가 이들 물질의 분비과정에 관여한다고 할 수 있을 것이다. 이들 매개물질들중 TNF- α 와 IL-1과 같은 proinflammatory cytokine, 직접 염증세포의 침윤을 이끄는 IL-8이나 MIP-2와 같은 chemokine 그리고 섬유모세포의 증식을 유도하는 PDGF와 TGF와 같은 성장인자들이 결정형 규산분진에 의한 염증성 섬유화성 반응과 관계가 깊을 것으로 생각되고 있다(Craighead, 1995). 본 연구에서는 결정형 규산분진에 의하여 철을 매개로 생산되는 독성이 큰 ROS들이 직접적인 세포독성 뿐 아니라 proinflammatory cytokine이나 chemokine의 분비를 자극할 것이며 이와 같은 일련의 반응들이 철을 제거하는 철착화제에 의하여 억제될 것이라는 가설을 세우고 실험관내 모델에서 실험하였다.

철이 전환 금속으로서 fenton catalyst로 작용하여 분진의 생물학적 활성도에 중요한 역할을 하는 것 뿐 아니라 콜라겐의 합성에 중요한 co-factor 인 proline hydroxylase의 활성도에 필수적이다. Hunt(1979)들은 섬유모세포 배양시 desferrioxamine를 첨가하였을때 DNA 합성이 억제되고 콜라겐 합성이 감소하였다고 하였으며 이를 hydroxyproline을 측정하여 증명한바 있어 여러 가지 기전으로 분진에 의한 섬유화반응에 방어효과를 보일수 있을 것으로 생각되었다.

분진에 따라 철의 함량이 다른데 석면이나 석탄분진과 같은 분진들은 분진내 철함량이 높고 석영은 비교적 낮다. 따라서 분진에 함유되어 있는 철과 분진의 생물학적 활성도와와의 관계는 주로 석면을 통하여 연구되어 있으나 다른 분진에서도 같은 영향을 미칠것으로 생각된다. 분진에 포함되어 있는 철을 비롯한 몇가지 금속들이 Fenton 반응을 통하여 산소기를 생산시키는 과정에 작용하는데 그중 철이 가장 중요하다. 특히 2가 철은 직접 Fenton 촉매제로 작용을 하나 분진에 포함된 철이 모두 생물학적 활성도를 갖는 것은 아니다. 3가 철은 체내에서 GSH, ascorbate, NADH, 또는 초과산화 이온과 같은 환원제에 의하여 redox cycle을 거쳐야 한다. 따라서 분진이 침착되어 있는 폐장내의 미세환경에 따라 분진표면에 얼마나 많은 반응성 철을 함유하게 될지가 결정되게 된다. 본 연구는 실험관내 연구임

으로 조건을 일괄적으로 맞추었으므로 생체내의 미세한 환경변화는 반영하지 못한다.

25 mM의 desferrioxamine에 3일간 처리하여 표면에 오염된 철을 제거하였다. desferrioxamine이 포함되지 않고 나머지 조건은 같이하여 대조군으로 사용할 석영을 처리하였다. desferrioxamine을 처리한 석영분진으로 세포를 자극한 경우 desferrioxamine으로 처리하지 않은 석영으로 자극할 때에 비하여 폐상피세포의 세포독성이 감소하였다. 따라서 desferrioxamine으로 처리하면 석영에 의한 세포독성을 억제할 수 있을 것으로 생각되었다.

세포막의 불포화지방산 또는 지방은 산소 유리기 특히 $\cdot\text{OH}$ 에 의하여 과산화 되면 세포막이 파괴되어 과산화물이 증가된다. 불포화지방산이나 지방이 과산화되면 일차적으로 hydroperoxide가 생기고 이것이 분해되어 aldehyde, keton, alcohol, hydrocarbon, ester, furan 그리고 lactone 등이 생긴다. Malonaldehyde(MDA)는 hydroperoxide의 중요한 분해산물로 MDA의 측정이 지질과산화의 정도를 정량화 할 수 있는 편리한 지표로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서도 석영분진에 의한 폐상피세포의 지질과산화 정도를 MDA의 양을 측정함으로써 정량하였는데 desferrioxamine으로 처리하는 경우 석영에 의한 지질과산화의 반응이 억제되었다.

규폐증의 주병변인 섬유화는 손상된 조직이 증식된 섬유모세포와 이세포에서 분비되는 콜라겐으로 치환되는 상태를 의미하는데 분진으로 자극한 폐상피세포로부터 분비된 물질이 섬유모세포에 미치는 영향을 알아봄으로서 그분진이 폐조직의 섬유화에 미치는 영향을 추정할 수 있다(김경아 등, 1996). 본 연구에서 결정형 규산분진으로 폐상피세포를 자극할 때 desferrioxamine을 같이 처리하는 경우 배양상층액에 의한 섬유모세포의 증식이 현저하게 억제되었는데 desferrioxamine이 결정형 규산분진에 의한 폐반응에서 세포독성효과나 염증성 매개물질을 억제할 뿐 아니라 섬유화 반응도 억제함을 알 수 있었다.

상피세포의 방어벽을 유지하는 것이 정상적인 폐기능을 유지하는데 중요한 조건이 된다. 분진에 폭로되어 진폐증이 유발되는 과정에서 상피세포의 손상은 조기변화이면서 병변을 진행을 예고하는 중요

한 인자가 된다(Donaldson, 1998). 폐장내 분진이 침착된 후 상피세포의 손상정도와 섬유화의 정도 사이의 강력한 관련성은 이미 알려진 바이다. 분진에 의하여 상피세포의 연속성을 잃게 되는데에는 반응성 산소기가 중요한 작용을 하는 것으로 생각되고 있다. 또한 상피세포는 분진과 직접반응하여 폐장내 염증 및 섬유화반응에 관여하는 여러 가지 cytokine 생산하는 능력을 가지고 있어 최근 여러 가지 폐의 간질성 섬유화 질환의 모델에서 목표세포로서 사용하고 있다(Nanneke 등, 1992; Chao 등, 1996; Bayram 등, 1998; Fiedler 등, 1998; Jyonouchi 등, 1998). 본 연구에서도 이에 근거하여 폐상피세포 세포주를 이용하여 세포독성 및 매개물질 생성능에 관한 연구를 실시하였다.

분진에 의한 질환발생과정에서 앞서 언급한 반응성 산소기의 2가지 효과 즉, 염증반응을 유도하는 직접적인 세포손상과 세포의 활성화 중 어느 쪽이 더 중요한 작용을 하는지는 확실하지 않다. 실험적 진폐증에서는 고농도의 분진을 흡입시킴으로 산소기에 의한 직접적인 세포손상이 두드러지나 실제로 작업장에서는 저농도로 지속적으로 폭로됨으로 염증세포의 활성화에 더 중요한 작용을 할 것으로 생각되며 아마도 정도의 차이는 있으나 두가지 모두 작용할 것으로 생각된다. 그리고 본연구 결과 고농의 분진 폭로에 의한 세포독성이나 저농도의 분진 폭로에 의한 세포 활성화 작용 모두 철 착화제인 desferrioxamine에 의하여 억제되었으며 진폐증의 궁극적인 조직변화인 섬유화 반응도 억제함을 실험관 모델을 통하여 알 수 있었다.

결 론

결정형 규산분진이 폐장내로 흡입되면 반응세포로부터 ROS의 생산이 증가된다. $\cdot\text{OH}$ 이 가장 반응성이 큰 ROS로서 초과산화 이온과 과산화수소의 반응에 의하여 생성되며 이 반응은 철과 같이 전환금속에 의하여 촉진된다. 그러므로 철이 결정형 규산분진의 생물학적 반응성에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 따라서 desferrioxamine과 같은 철 착화제가 결정형 규산분진에 의한 병리적 변화에 억제효과 또는 치료효과를 나타낼 것으로 생각되는바 이를 실험관내 모델에서 알아보았다.

1. 결정형 규산분진과 양성대조군인 crocidolite의 fenton activity가 대조군에 비하여 유의하게 증가되었으며 desferrioxamine으로 처리하였을 때 fenton activity가 현저하게 감소하였다.

2. 결정형 규산분진이 양-반응 관계를 보이면서 폐상피세포 세포막의 지질과산화물을 유도하였으며 desferrioxamine으로 처리하였을 때 세포막의 지질과산화물의 지표인 MDA 농도가 현저하게 감소하였다.

3. 결정형 규산분진의 농도가 증가할수록 폐상피세포의 세포독성이 증가하였다. desferrioxamine 처리군에서 처리하지 않은 군에 비하여 폐상피세포의 세포독성 유의하게 감소하였다.

4. 폐상피세포를 결정형 규산분진으로 자극하였을 때 대조군에 비하여 배양 상층액내 TNF α 와 IL-8의 농도가 유의하게 증가하였으며 desferrioxamine으로 처리하는 경우 이들 cytokine의 농도가 처리하지 않은 군에 비하여 유의하게 감소하였다.

5. 폐상피세포를 결정형 규산분진으로 24시간동안 처리하고 배양한 상층액은 섬유모세포의 증식을 유의하게 증가시켰으며 desferrioxamine으로 처리하는 경우 그 증식율은 현저하게 감소하였다.

본 연구결과 desferrioxamine이 결정형 규산분진에 의하여 발생될 수 있는 염증 및 섬유화반응을 억제할 수 있을 것으로 생각 되었다.

인용문헌

김경아, 이동원, 임영, 윤임중. 석면이 흰쥐폐의 섬유모세포 증식에 미치는 영향. 대한산업의학회지. 1996;8(3):392-402.

윤임중. 진폐증의 최신지견, 서울 : 의학문화사, 1998

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;18:441-448.

Burtler J, Halliwell B. Reaction of iron-EDTA chelates with the superoxide radical. Arch Biochem Biophys. 1982;218(1):174-178.

Chao CC, Park SH, Aust AE. Participation of nitric oxide and iron in the oxidation of DNA in asbestos-treated human lung epithelial cells.

Arch Biochem Biophys. 1996;326(1):152-157.

Collart MAP, Baeuerle, P Vassalli. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages : involvement of four κ B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF κ B. Mol Cell Biol. 1990;10:1498-1506

Craighead JE. Pathology of Environmental and Occupational Disease. St. Louis, 1995, Mosby

Dalal NS, Shi X, Vallyanthan V. Role of free radical in the mechanism of hemolysis and lipid peroxidation by silica : comparative EST and cytotoxicity studies. J Toxicol Environ Health. 1990;29:307-316

Donaldson K. Mechanism of Pneumoconiosis, in Occupational Lung Disease. An International Perspective(eds. Bans DE, Parker JE). London : Chapman & Hall, 1998

Doelman CJA, R Leurs, WC Oosterom. A Bast. Mineral dust exposure and free radical lung damage. Exp Lung Res. 1990;16:41-55.

Fiedler MA, Wernke-Dollries K, Stark JM. Inhibition of TNF- α -induced NF- κ B activation and IL-8 release in A549 cells with the protease inhibitor MG-132. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998;19:259-268.

Halliwell R, Gutteridge JMC. Oxygen free radical and iron in relation to biology and medicine : some problems and concepts. Arch Biochem Biophys. 1986;246:501-514

Hunt J, Richards RJ, Harwood R, Jacobs A. The effect of desferrioxamine on fibroblasts and collagen formation in cell cultures. Br J Haematol. 1979;41(1):69-76

Janssen YMW, B Van Houten, PJA Borm, BT Mossman. Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. Lab Invest. 1993;69:261-274.

Jyonouchi H, Sun S, Abiru T, Charenchovanich, Ingbar DH. The effects of hyperoxic injury and antioxidant vitamins on death and proliferation of human small airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998;19:426-436.

Kamp DW, Gracefla P, Pryor WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced disease. Free Radic Biol Med 1992;12:293-315. Biochem Biophys. 1989;228:373-376

Larsson R, P Cerutti. Oxidants induce phosphorylation of ribosomal protein S6. J Biol Chem. 1988;263:17452-17458.

- Nanneke AA, Wal VD, Smith LL, Hohannes FLM, Oirschot V, Asbek SV. Effect of iron chelators on paraquat toxicity in rats and alveolar type II cells. *Am Rev. Respir Dis*:145:180-186.
- Schapira RM, Ghio AJ, Effros RM, Morrisey J, Dwson CA, Hacker AD. Hydroxyl radicals are formed in the rat lung after asbestos instillation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;10:573-579.
- Schapira RM, Ghio AJ, Effros RM, Morrisey J, Almapro UA, Dawson CA, Hacker AD. Hydroxyl radical production and lung injury in the rat following silica or titanium dioxide instillation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:220-226.
- Simeonova PP, Luster MI. Iron and reactive oxygen species in the asbestos-induced tumor necrosis factor α from alveolar macrohages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;12:676-683.
- Vallyathan V, Mega JF, Shi X, Dala NS. Enhanced generation of free radical from phagocytes induced by mineral dusts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;6:404-413