

유리규산, 석면 그리고 인조섬유에 의한 세포독성 및 Apoptosis**

가톨릭대학교 성모병원 산업의학과, 영남의료원 고려산업의학센터*

임 영 · 김경아 · 김흥남 · 이동원 · 조원섭* · 윤임중

— Abstract —

Cytotoxicity and Apoptosis by Silica, Asbestos and Man-Made Mineral Fibers

Young Lim, Kyoung Ah Kim, Heung Nam Kim,
Dong Won Lee, Won Seop Cho*, Im Goung Yun

*Department of Industrial Medicine, St. Mary's Hospital, College of Medicine, Catholic University
Korea Industrial Medical Center, Young Nam Medical Center**

Exposure to various particles and fibers can result in lung inflammation that may progress to fibrosis, even lung cancer for which there is no effective clinical treatment now. The mechanism involved in pulmonary injury has not been well defined; however, most current evidence implicates a central role for alveolar macrophages(AM) in this process. Also apoptosis or programmed cell death is regarded as a mechanism which is related with the pulmonary fibrosis.

We propose that the cytotoxic potential of various particles may be evaluated by measuring lactic dehydrogenase(LDH) from particle co-cultured supernatant and these particles may induce the characteristics of apoptosis, DNA ladder. We analyzed rat AM culture media which was incubated for 3 days with the same concentration (10 ug/ml) of silica(Si), chrysotile(Ch), crocidolite(Cr), ceramic fiber(CF), rock wool(RW) and glass wool(GW). And each particles(50ug/cm²) was incubated with A549(pneumocyte in tracheal epithelium) cell lines for 24 hours to confirm the DNA ladder. Additionally, silica induced apoptosis *in vivo* was confirmed by electromicroscopic observation.

The results were as follows;

** : 이 논문은 1997년도 학술진흥재단의 대학부설 연구소 연구과제 연구비에 의하여 연구되었음.

1. Silica, asbestos and man-made mineral fibers(MMMF) co-cultured with AM showed the increase of LDH significantly with the time interval of 24, 48, 72 hours except for ceramic fiber in 48 and 72 hours and crocidolite in 72 hours.

2. Silica, asbestos and man-made mineral fibers(CF, GF) showed the characteristics of apoptosis, DNA ladder, which was induced by incubating A549 cell with each particles for 24 hours in vitro

3. Apoptotic alveolar macrophage was observed the findings of zeiosis(membrane blebbing), condensation of nuclear chromosome and many vacuoles in cytoplasm, electromicroscopically.

Key Words : Silica, Asbestos, Man-made mineral fiber, Cytotoxicity, Apoptosis

서 론

Asbestos는 자연계에서 존재하는 광물성 섬유(fibrous mineral)로 규산염 섬유 상태로 존재하는데 물리·화학적으로 고강도, 내열, 내마모, 방음, 단열성 등의 특징을 가지고 있어 공업화와 함께 최근까지 다량으로 사용되었다(김경아, 1995). 그러나, asbestos에 의한 건강 장애는 폐의 섬유화를 유발하는 석면폐증외 폐암과 악성 중피종이 밝혀지면서(이관형과 이경용, 1992) asbestos의 대체물질이 필요하게 되었고, 이에 여러 종류의 man-made mineral fiber가 개발되어, 1972년 이후에는 그 사용이 증가하고 있다(Morgan, 1984). Man-made mineral fiber의 종류에는 glass wool, rock wool, ceramic fiber, steel fiber, carbon fiber, polypropylene fiber 등이 있으며, asbestos와 물리적, 화학적 유사한 특성을 가지고 있어 세계적으로 매년 500만톤 이상 생산되어 쓰이고 있다(오세민, 1987). 이들 man-made mineral fiber들은 대부분 비결정형 규산염(amorphous silicate)으로 길이대 너비의 비가 3:1 이상의 섬유형태로서 그 독성과 건강장애에 대해서는 아직 잘 알려지지 않은 상태이다(Rom, 1992). 섬유화성 분진의 독성작용을 예측하기 위하여 *in vivo* 에서 man-made mineral fiber를 동물에 주입하거나 흡입시키는 연구가 수행되었지만(Adachi등, 1991; Hori 등, 1994), 시간과 경비, 실험조건 등의 문제점을 보완하기 위해 *in vitro* 에서 여러 종류의 세포를 사용하는 연구를 실행하게 되었다(Brown등, 1980; Mossman과 Sesko, 1990; Koshi 등, 1991;

Pelin 등, 1992; Hesterberg 등, 1993).

한편 유리규산분진에 폭로된 후 일어나는 폐의 염증반응과 폐섬유화에 대하여 여기에 관련된 기전 즉, 산소유리기, cytokine, 세포외 기질단백증가 등이 발표되었지만 아직 특별한 치료방법이 없는 실정이다. 실험동물에서의 유리규산 투여에 의한 실험진폐증모델에서 폐포대식세포의 증가, 임파구와 2형 폐포세포, 섬유모세포의 증식이 뚜렷하며 이중 중심역할은 폐포대식세포로 간주되며 활성화된 폐포대식세포로부터의 섬유화인자와 각종 cytokine의 분비는 이미 알려진 바와 같다. 이와 같은 생체내 실험결과와 대조적으로 *in vitro* 실험에서 사람이나 쥐에서 기관지 폐포세척술에 의한 폐포대식세포에 유리규산을 노출시킨 후 측정된 결과에서 cytokine의 분비는 그다지 높지 않았으며 이러한 현상에 대한 설명으로 세포독성을 유발시키는 분진독성과 용량-반응, 그리고 유리규산분진 자체의 apoptosis유발을 들 수 있다. 유리규산에 의한 apoptosis는 그 정확한 기전과 함께 목표세포, 세포피사와의 관련성에 대하여도 아직 알려진 바가 없으며 다만 실험 진폐증의 조직에서 apoptosis 만이 관찰된 바 있다(안형숙, 1996).

Lactate dehydrogenase (LDH)는 생물계에 널리 분포하는 대표적인 효소이며, 모든 세포가 비교적 풍부하게 LDH를 포함하고 있다. 세포가 손상을 받은 후 LDH는 세포막 밖으로 흘러나와 세포 손상의 정도를 확인하는데 널리 이용되고 있다(이귀녕과 김진규, 1988). 광물섬유들에 의해 폐포대식세포가 손상을 받는다는 것은 최근 많이 보고되었지만, 광물섬유들이 일으키는 독성정도를 silica, asbestos, man-made mineral fiber 각각에서 비교한 보고

Table 1. Size Distribution of Man-made & Natural fibers

unit : μm

Type of mineral fiber	Geometric mean length	Geometric SD	Range
Crocidolite	12.07	1.74	5~31
Chrysotile	23.10	1.81	5~33
Rock Wool	20.46	1.61	5~50
Ceramic Fiber	21.05	1.72	6~58
Glass Wool	13.64	1.67	7~23

는 거의 없는 실정이기 때문에 본 실험에서는 독성이 큰 것으로 알려진 silica, chrysotile, crocidolite와 몇 가지 인조광물섬유가 폐포대식세포에 가해졌을 때 LDH (lactate dehydrogenase)를 parameter로 하여 광물섬유들에 의한 폐포대식세포의 손상을 관찰하고, DNA ladder와 전자현미경으로 apoptosis를 확인하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험분진

1) 유리규산 (free silica)

실험에 사용된 silica (Sigma Chemical Co., U.S.A.)는 입자크기가 0.5-10 μm 이고, 그중 1-5 μm 크기의 분진은 약 80%였다.

2) 석면

Chrysotile, crocidolite는 日本作業環境測定協會에서 표준화한 시료를 입수하여 사용하였다. 사용된 asbestos의 길이를 일정하게 하기 위하여 침강방법 (sedimentation method)으로 분류하여 사용하였다. 침강방법은 wide-mouth bottle에 asbestos와 증류수를 넣고 2시간 동안 초음파 처리 (sonication)하고 24시간 방치하였다가 침강정도에 따라 섬유를 분리하여 섭씨 50도에서 완전히 물기를 증발시킨 후 섬유를 끊어서 사용하였다.

Asbestos 그램당 섬유수를 측정하기 위하여 pore size가 0.8 μm 인 cellulose ester membrane filter를 vacuum filter system에 연결하여 적당한 농도로 희석한 asbestos 현탁액 1 ml를 여과시킨 후 95% ethanol로 세척하였다. Membrane filter를 건조시킨 후 slide glass 위의 acetone vapor로 고정하였다.

Table 2. Numbers of Man-made & Natural fibers per μg

Type of Mineral Fiber	Number of fiber/ μg
Chrysotile	86,999.63
Crocidolite	60,015.79
Ceramic Fiber	9,770.01
Glass Wool	23,186.10
Rock Wool	2,093.57

Asbestos는 Walton-Beckett graticle이 삽입된 위상차현미경으로 400배 배율에서 주의 깊게 관찰하여 μg 당 섬유수로 환산하였고 asbestos의 길이도 같이 측정하였다.

3) 인조섬유

Ceramic fiber (CF), glass wool (GW), rock wool (RW)은 Japan Industrial Safety & Health Association (JISHA)에서 표준화 된 것을 공급받아 사용하였다. Table 1은 본 실험실에서 측정한 각 섬유길이의 기하평균 및 표준편차이고 각 섬유별 μg 당 개수는 현미경상 $\times 4000$ 배율에서 4 field를 측정하여 평균한 결과 Table 2와 같다.

2. 실험방법

1) 흰 쥐의 폐포대식세포에서 LDH 측정

- LPS (lipopolysaccharide) 투여
 체중이 250-300 그램의 암컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 선정하여 경부를 절개하고, ketamine (25 mg/kg)을 근육 주사하여 전신 마취시킨 후 기관을 노출시키고, 생리식염수 1ml에 LPS (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 0.2mg이 함유된 의 생리식염수를 5ml기도내로 주입하여 24시간 방치하였다.

- 폐포대식세포의 획득

흰쥐에 urethane (0.12 g/100 gm)을 복강내에 주사하여 마취한 후 개흉하여, 기관을 절개한 후 정맥도자를 기관지에 삽입하였다. 삽입된 도자를 이용하여 37°C 생리식염수 0.3 ml/체중(g)을 10회로 나누어 기관지 세척을 시행하고, 회수된 세척액을 50 ml falcon tube에 모은 후 즉시 얼음속에 보관하였다. 기관지 폐포 세척액을 1,000 rpm으로 10분간 4°C에서 원심 분리한 후 남은 세포 침전물을 인산완충액에 부유시켜 2회 세척한 후 cytometer로 세포수를 측정하였다. 세포 생존율은 trypan blue exclusion법으로 계산하였다.

- 분진투여

폐포대식세포를 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM(Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A) 배지에 부유시켜, culture dish에 배지 1 ml에 폐포대식세포가 1×10^6 개씩 되도록 분주후 2시간동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 상층액을 걷어내어, DMEM 배지로 세 번 세척하였다. Culture dish에 DMEM 배지 1ml를 주입하고, silica(Si), chrysotile(Ch), crocidolite(Cr), ceramic fiber(CF), glass wool(GW) 및 rock wool(RW)을 각각 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 정량한 후 주입하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1, 2, 3일 동안 배양한 후, 상층액을 모아 LDH측정을 위하여 -70°C 냉동고에 보관하였다.

- LDH(Lactate dehydrogenase) 측정

상층액의 LDH(Lactate dehydrogenase)활성치는 Wroblewski - LaDue법(Wroblewski & LaDue, 1955)을 사용하여 LDH 자동분석기(Hitachi 747, Japan)를 이용하여 측정하였다.

2) 흰 쥐 폐포대식세포의 전자현미경관찰

유리규산 분진 40mg을 0.5ml의 생리식염수에 혼합한 후 LPS와 같은 방법으로 기도내 주입한 후 봉합하고 1주째에 도살하였다. 이 때 좌측기관지에 2.5% glutaldehyde-2% paraformaldehyde 혼합액을 주입하여 팽창 고정시킨 다음, 병변부위에서 조직을 2mm 정도로 잘게 잘라 내어 같은 고정액에 재고정하였고, 세척용액(4.5% sucrose in 0.1M

phosphate buffer)으로 씻은 다음 1% OsO₄액에 2시간 후고정하였으며, 다시 세척 및 탈수과정을 거쳐 Epon812로 포매하여 ultramicrotome(LKB-V, Sweden)으로 50-60nm두께의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 전자현미경(JEM-1200EX, Jeol, Japan)으로 폐포대식세포의 미세구조를 관찰하였다.

3) A549 세포에서 apoptosis

CCL 181 (A549, American type culture collection)은 10% FBS 가 포함된 Ham's F12K(GIBCO BRL)을 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. Tryphan blue exclusion test 로 90%이상 생존을 확인한 후 1×10^6 개의 세포를 60mm plate에 유리규산, 석면섬유(chrysotile), 유리 및 세라믹섬유를 각각 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 가한 후 24시간 배양하였다. 배양후 PBS를 이용하여 세포를 세척한 후 apoptosis DNA ladder kit(Boehringer Mannheim, Seoul, Korea)을 사용하여 DNA를 분리하였다. 이와같이 추출한 DNA는 Spectrophotometer로 같은 농도로 정량(50ng/ml)한 후 2% agarose gel(BRL)에서 50 volt, 2 시간 전기영동하여(50mM Tris.HCl, pH 7.8 TEbuffer) ethidium bromide에 의한 DNA ladder를 확인하였다.

4. 통계학적 분석

모든 실험은 재현성과 정확도를 보기 위하여 3번 반복하여 실시하였으며 결과는 평균±표준편차로 표현하였고, 대조군과의 비교는 Student's t-test로 유의성을 검정하였다.

성 적

1. 분진투여 이후 24, 48, 72시간 후 Lactate dehydrogenase의 변화 (Fig. 1)

1) 24시간 경과시

분진들을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 폐포대식세포에 주입하여 24시간 배양한 후 LDH를 측정한 성적은 대조군은 37.0 ± 1.0 이며, silica는 50.0 ± 1.0 , crocidolite는 47.0 ± 1.0 , chrysotile은 48.0 ± 1.0 , ceramic fiber는 48.0 ± 1.0 , rock wool은 45.0 ± 1.0 , glass wool은 54.0 ± 1.0 이었다. 이를 서로

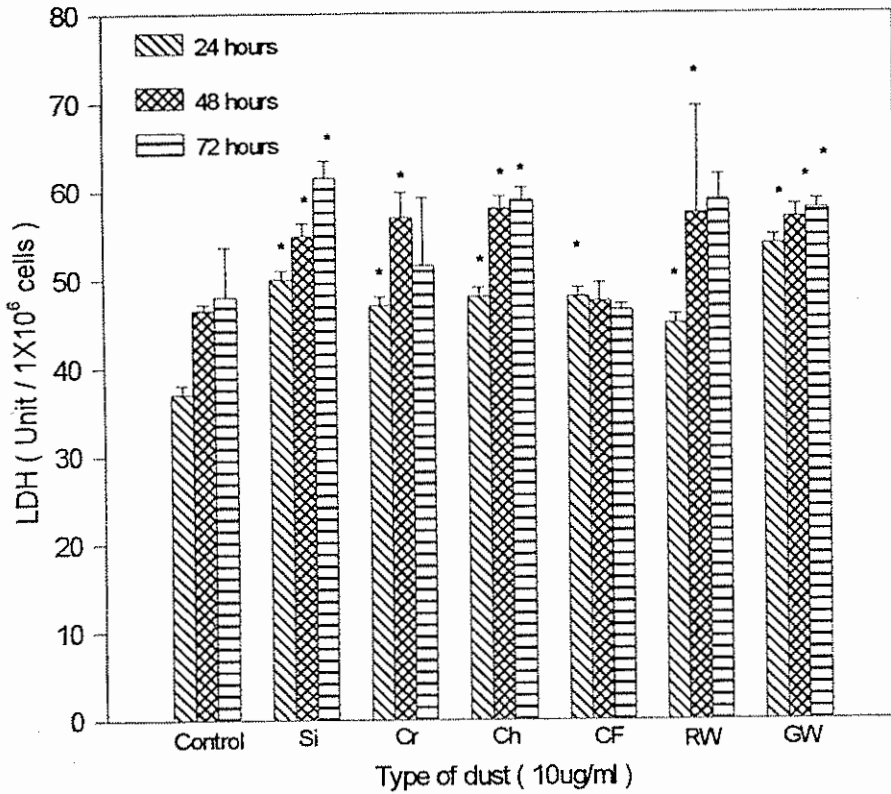


Fig. 1. Release of LDH in AM exposed to each dust
 * :p<0.05 compared with the control of 24,48 and 72 hr

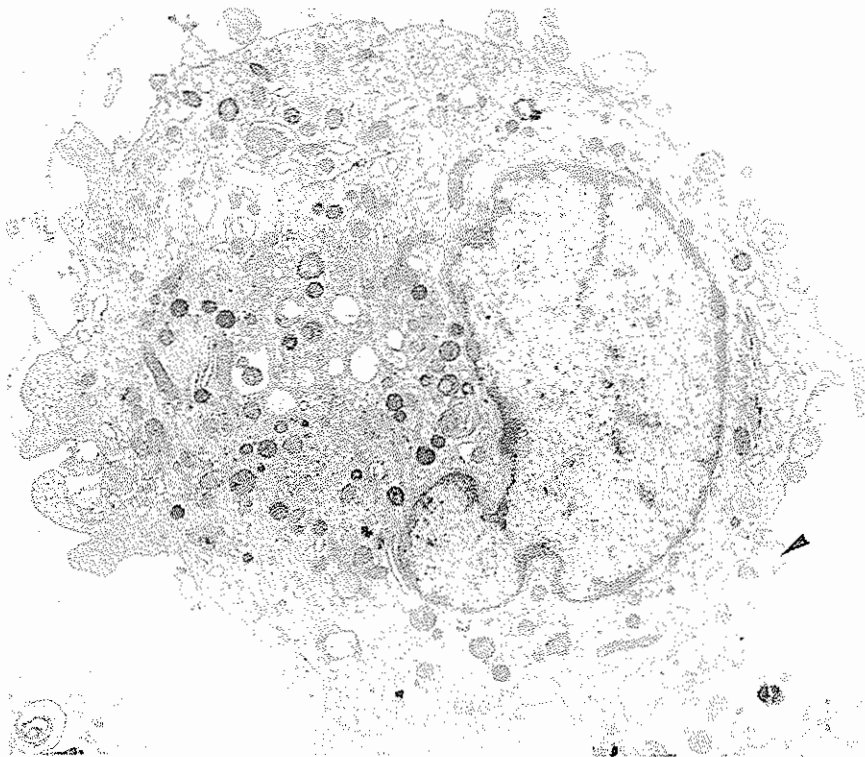


Fig. 2. Electron micrograph of alveolar macrophage at the 24 hours showing zeiosis(arrow), many vacuoles in cytoplasm and condensed chromosome in nucleus. x12000.

비교한 결과는 모두 유의한 차이를 나타냈다.

2) 48시간 경과시

분진들을 10 µg/ml의 농도로 폐포대식세포에 주입하여 48시간 배양한 후 LDH를 측정 한 성적은 대조

군이 46.5±0.7 이며, silica는 55.0±1.4, crocidolite는 57.0±2.8, chrysotile은 58.0±1.4, ceramic fiber는 47.5±2.1, glass wool은 57.0±1.4, rock wool은 57.5±12.0, 이었다.

3) 72시간 경과시

분진들을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 폐포대식세포에 주입하여 72시간 배양한 후 LDH를 측정 한 성적은 대조군이 48.0 ± 5.6 , silica는 61.5 ± 1.9 , crocidolite는 51.5 ± 7.7 , chrysotile은 59.0 ± 1.4 , ceramic fiber는 46.5 ± 0.7 , glass wool은 58.0 ± 1.0 , rock wool은 59.0 ± 2.8 이었다.

2. 분진(40mg)을 흰쥐에게 주입한 후 폐포대식세포의 전자현미경 (Fig. 2)

폐포대식세포는 세포질 내 많은 식소체와 공포가 관찰되며 세포막은 apoptosis의 특징인 수포현상(zeiosis)을 보이고 있으며 핵내에는 염색질의 응축을 나타내고 있다

3. 분진에 의한 DNA ladder (Fig. 3)

세포 배양접시의 cm^2 당 각각 50 μg 의 Si, Ch, Cr, CF, GW로 24시간 자극 후 세포에서 추출한 DNA는 분진의 종류에 관계없이 180 - 200 bp의 일정한 ladder band의 형태로 나타났다.

고 찰

최근 Bitterman등(1986)은 분진에 의한 폐질환에서 폐장내 있는 여러 종류의 세포간 연락작용(network)이 매우 중요한 기능을 하는데 그 중에서도 특히 세포간 신호 전달 과정에서 폐포 대식 세포의 역할이 중심이 된다는 것을 발표한 바 있으며 이러한 상호 작용에서의 불균형이 폐의 섬유화를 유발한다(Mossman et al, 1986)고 하였다. Kelly J. (1990)는 섬유화 과정에서 TNF(Tumor necrosis factor)가 IL-1 (Interleukin-1) 과 함께 가장 큰 변수로 작용함을 연구 한 바 있는데 TNF는 세포 조절, 증식 그리고 호중구를 병변 부위로 불러들이는 동시에 과산화 이온의 생성과 단백질 분해 효소에 의한 폐의 직접적 손상을 유발한다. Akihiro등(1995)은 석면의 기도 주입으로 TNF 생성이 증가하며 또한 석면 섬유와 함께 배양시킨 폐포 대식 세포에 의하여 생산된 TNF가 세포질 내 lysosomal enzyme 과 직접적인 상관 관계를 보이므로 in vitro에 의한 LDH의 측정이 섬유성 분진에 의한 in vivo 섬유

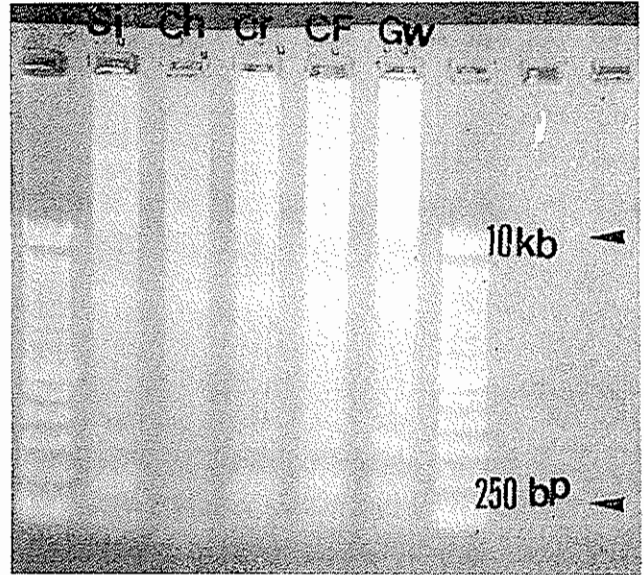


Fig. 3. DNA ladder formation of each dust-treated A549 cell. lane 1 & 7; 1kb DNA ladder, lane 2; silica, lane 3; chrysotile, lane 4; crocidolite, lane 5; ceramic fiber, lane 6; glass fiber

화를 예측하는데 도움이 된다(Davies et al, 1976; Davies, 1976; Brody, 1991)고 하였다.

본 연구에서는 실험 진폐증의 동물 모델을 만드는 데 있어 가장 민감하다고 알려진 흰쥐에서 채취한 폐포대식세포에 여러 가지 분진과 man-made mineral fiber를 함께 3일간 배양하여 나타나는 세포 독성을 세포 배양액 내 LDH를 측정하여 섬유질의 물리·화학적 성질과 함께 비교 연구 하고자 하였다. 규폐증을 일으키는 대표적인 물질인 silica와 석면 폐증을 유발하는 asbestos 2종 (Chrysotile, Crocidolite)은 이미 폐포 대식 세포를 자극하는 물질로 알려져 있으며 물리·화학적 성질이 표준화되어 그 자체의 독성을 연구함에 있어 별 문제가 없으나 man-made mineral fiber는 그 제조국, 회사에 따라 그 크기나 밀도에 많은 차이가 있어 연구 보고자에 따라 큰 차이가 있다. 즉, Nadeau (1987)는 CF가 Chrysotile이나 다른 섬유성 분진보다 LDH와 β -galactosidase가 높다고 보고한 것에 반하여 Akihiro 등(1995)은 CF가 다른 섬유보다 오히려 LDH 값이 낮다고 하였다. 이는 쥐의 폐포 대식 세포의 직경은 약 7-14 μm 이므로 Akihiro등이 CF의 기하평균길이 가 29.5 μm , 기하평균너비가 1.92 μm 의 섬유를 사용한 데 비하여 Nadeau 등은 기하평균

길이 가 8.3 μm , 기하평균너비가 0.1-0.2 μm 인 시료를 이용했기 때문에 Akihiro 등의 실험에서 폐포대식 세포가 CF를 탐식 작용하는데 문제가 있어 제대로 독성을 나타내지 못한 이유를 들고 있다. 본 연구도 CF의 길이가 21.05 μm 으로 측정되었고 세포 독성의 지표로써 LDH 분비도 24시간만 유일하게 유의한 차이를 보였다. 즉, 섬유유 독성검사에는 그 자체의 물리·화학적 성질을 고려해야 하는데 일반적으로 길고 섬세한 섬유성분진이 *in vitro* 실험에서 세포 독성을 잘 유발한다는 보고 (Stanton 과 Wrench, 1972; Poti 과 Friedrichs, 1972; Chamberlain 과 Brown, 1978; Nadeau 등, 1983; Tilkes과 Beck, 1983)가 있으며 특히 rock wool은 체내 분해력이 높아 세포 독성이 비교적 낮다고 알려져 있다. LDH는 자극후 12-24 시간에 증가하기 시작하여 48-72 시간에 최고치에 도달하므로 본 연구에서도 3일까지의 증가를 관찰하였다. Silica 과 asbestos 그리고 3종의 man-made mineral fibers가 10ug/ml의 농도에서 배양 3일까지는 2,3일의 CF와 3일의 Cr를 제외하고 모두 대조군과 비교하여 LDH의 유의한 증가를 보였으나 3일 이후에는 점차 감소하여 이는 분진이나 섬유유의 독성으로 인한 사멸에 기인한 것으로 추정되었다. 또한 보통 LDH를 연구할 때 ELISA kit를 쓰는데 반하여 이번에 측정 방법으로 사용한 혈액 자동 분석기 (Hitachi, Japan)는 실험실에서 혈액 생화학 분석용으로 매우 널리 쓰이는 기계로 세포의 배양 상층액을 분석한 LDH 성적이 ELISA kit와 별 차이를 보이지 않고 3일까지 대조군에 비하여 민감한 반응을 보여 향후 세포배양시 이용하면 쉽게 그 독성을 관찰할 수 있을 것으로 생각되었다. 또한 GW, RW, CF의 3종의 man-made mineral fiber가 모두 시간에 따라 LDH의 증가를 보여 결과적으로 이러한 LDH의 차이는 섬유유의 크기나 용해도 등의 물리·화학적 성질과 밀접한 연관이 있으므로 균일한 크기, 성분의 표준 시료를 개발하여야 할 것이다.

섬유화성을 가진 분진을 탐식하는 과정에 있어 apoptosis가 연관되어 있다고 하는 보고 (Raymond 등, 1996)가 늘고 있는데, apoptosis는 세포사의 한 형태로 괴사(necrosis)와는 구별되는 현상이며 특징으로는 세포의 핵내에 존재하는 염색질의 응축, 세포질의 수축, 소포체의 팽창과 세포막의 수포현상 등이

있다. 이들은 bleomycin에 의한 사람의 폐포대식세포내 apoptosis를 이미 보고하였으며 이를 폐섬유화의 한 과정으로 설명한 바 있는데 즉 종양이나 AIDS에서 apoptosis의 통제가 되지 않는다는 것과 유사한 병리현상으로 유리규산의 자극으로 인한 폐포대식세포의 급격한 증가와 함께 세포의 수축과 DNA의 180-200 bp 절단을 그 특징으로 들 수 있다

본 실험에서 10ug/ml의 농도로 LDH를 관찰하였으며 *in vivo*에는 40mg의 유리규산을 사용하였고 DNA ladder를 보기 위하여 50ug/cm²의 다양한 용량을 사용한 것은 각각의 실험이 최적반응을 보이기 위하여 여러 참고문헌과 예비실험을 통하여 얻어진 결과이다. 다른 실험 (Rashi 등, 1996)에서 이와 같은 apoptosis 현상을 유리규산 cm²당 133 μg 의 유리규산 농도로 실험하였는데 이와 같은 고농도에서 단시간 처리함으로써 apoptosis는 잘 보일지 모르지만 상당히 높은 세포독성을 초래할 것으로 생각되어 본 연구는 band가 나타나는 최저농도를 택하였다. 특히 DNA ladder는 여러 분진 및 섬유유에 의하여 DNA가 손상되어 원하는 일정한 형태를 얻기가 매우 어려웠으며 이 결과를 좀 더 확실히 보고 괴사(necrosis)와의 명확한 구분을 위하여 Annexin V-Fluos(BMS, Seoul)을 사용한 실험을 진행중이다. 원리는 apoptosis의 초기 단계에 세포막이 구조적 변화를 일으켜 내부의 phosphoserine이 외부로 이동됨에 따라 이에 특이적으로 반응하는 염료를 사용함으로써 괴사와 구분이 가능해지고 이와 동시에 Flow cytometry 분석으로 정량이 가능할 것으로 생각된다.

최근 apoptosis는 섬유화성 뿐 아니라 senescence(노쇠)와도 연관되어 있다는 보고가 늘고 있으나 아직 그 확실한 기전은 밝혀지지 않았다 단지 apoptosis가 염증과 다른 non-inflammatory반응임을 고려할 때 scavenger receptor결합에 의한 신호변환계에 관한 연구가 수반되어야 할 것이다.

맺 음 말

Asbestos는 자연계에서 존재하는 광물성 섬유유의 총칭으로 공업화에 따른 asbestos의 사용이 증가하여 장기간의 노출에 의한 석면폐증, 폐암, 악성 종피증 등을 유발한다고 알려 지던중 asbestos의 대체 물질이 필요하여 man-made mineral fiber가 개

발되었다. 그러나 man-made mineral fiber 또한 asbestos와 유사한 구조적 성질을 가지고 있어 이에 대한 다각적 연구를 필요로 한다.

따라서, 본 연구는 silica, asbestos, man-made mineral fiber에 대한 세포 독성을 보기 위하여 폐포 대식세포에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 상기 분진을 주입하여 1-3일 배양후 생성되는 LDH의 양을 자동분석기로 측정하여 man-made mineral fiber와 asbestos가 생체에 미치는 독성을 간접적으로 측정하고 이와 별개로 A549 세포에 다양한 분진(50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)을 처리한 후 DNA와 흰쥐에 유리규산을 40mg기도내 주입한 후 24시간의 폐포대식세포의 전자현미경에서의 형태를 관찰하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1 Silica, asbestos 그리고 man-made mineral fiber는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 배양 3일까지 LDH의 유의한 상승을 보였고 분진이나 섬유간의 큰 차이는 나타나지 않았으나, 3일 부터는 분진에 따라 LDH 분비에 있어 불규칙한 양상을 보였다.

2. 유리규산과 석면 그리고 인조섬유(CF, RW, GW)는 모두 180-200bp의 DNA ladder를 나타냈다.

3. 유리규산을 처리한 흰쥐의 폐포대식세포는 apoptosis의 특징적인 세포막의 수포화(zeiosis), 핵내 염색질의 응축, 세포질의 공포화가 잘 관찰되었다.

REFERENCES

- 김경아. 석면관련 질환과 폐장내 잔류 석면. 한국의 산업의학 1995; 34(3) : 75 - 79.
- 안형숙. 유리규산과 청석면에 의한 실험진폐증에서의 아포포토시스. 가톨릭대학교 산업보건대학원 학위논문집 1996(5); 41 - 61.
- 오세민. 석면 취급 현황. 노동과학 1987; 27 - 31.
- 이귀녕, 김진규. 임상화학. 의학 문화사, 1988.
- 이관형, 이경용. 석면 취급 근로자의 직업병에 대한 인식 및 태도. 예방의학회지 1992; 25(3) : 269 - 286.
- Adachi S, Takemoto K, Kimura K. Tumorigenicity of fine man-made mineral fibers after intracheal administrations to hamsters. Environ Res 1991; 102: 314 - 23.
- Fujino A, Hori H, Higashi T, Morimoto Y, Tanaka I, Kaji H. In-vitro biological study to evaluate the toxic potentials of fibrous materials. Int J Occup Environ Health. 1995; 1: 21 - 28.
- Bitterman PB, Weavers M, Rennard SI, Adelberg S, Crystal RG. Modulation of alveolar macrophage-driven fibroblast proliferation by alternative macrophage mediators. J Clin Invest. 1986;77: 700 -708.
- Brody AR. Production of cytokines by particle-exposed lung macrophages. Cellular and molecular aspects of fiber carcinogenesis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 1991, 83 - 102.
- Brown RC, Gormley I, Chamberlain M, Davies R. (Eds.). In-vitro effects of Mineral Dusts. Academic Press, London. 1980.
- Chamberlain M, Brown RC. The cytotoxic effects of asbestos and other mineral dust in tissue culture cell lines. Br J Exp Pathol, 1978; 59: 183 -203..
- Davies P, Allison AC. Secretion of macrophage enzymes in relation to the pathogenicity of chronic inflammation. In: Nelson DS, ed. Immunobiology of the Macrophage. New York, NY: Academic Press, 1976, . 427 - 61.
- Davies R. The effect of mineral fibers on macrophages. In: Wagner JC, ed. Biological Effects of Mineral Fibers, LARC Sci Publications. 1976: 1(30): 419 - 25.
- Hesterberg TW, Hart GA, Bunn WB. In vitro toxicology of fibers: mechanistic studies and possible use for screening assays. In: Fiber Toxicology. San Diego, CA: Academic Press, 1993, 139 - 70.
- Hori. H, Kasai T, Haratake J. Biological effects of inhaled magnesium sulphate whiskers in rats. Occup Environ Med. 1994; 51 : 492 - 9.
- Kelley J. Cytokines of the lung. Am Rev Respir Dis 1990; 141: 765 - 88.
- Koshi K, Kohyama N, Myojo T, Fukuda K. Cell toxicity, hemolytic action and clastogenic activity of asbestos and its substitute. Ind Health 1991; 29 : 37 - 56.
- Morgan WKC, Seaton A. Occupational lung diseases. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1984, 323 - 376.
- Mossman BT, Gilbert R, Doherty J, Shatos MA, Marsh J, Cutroneo K. Cellular and molecular mechanisms of asbestosis. Chest 1986;89; 1608 - 1616.
- Mossman BT, Sesko AM. In vitro assay to predict the pathogenicity of mineral fibers. Toxicology, 1990; 60 : 53- 61.
- Nadeau D, Fouquette-Couture L, Paradis D, Lane KJ, Dunnigan J. Cytotoxicity of respirable

dusts from industrial minerals: comparison of two naturally occurring and two man-made silicates. *Drug Chem Toxicol.* 1987; 10: 49 - 86.

Nadeau D, Paradis D, Gaudreau A, Pele JP, Calvert R. Biological evaluation of various natural and man-made mineral fibers: Cytotoxicity, hemolytic activity and chemiluminescence study. *Environ Health Perspect* 1983; 51: 374 - 382

Pelin K, Husgafvel-Pursiainen K, Vallas M, Vanhala E, Linnainmaa K. Cytotoxicity and anaphase aberrations induced by mineral fibers in cultured human mesothelial cells. *Toxicology in vitro* 1992; 6 : 445 - 50.

Pott F. and Friedrichs K.M.. Tumoren der ratte nach i.p.-Injektion faserfotmiger Staube. *Naturwissenschaften*, 1972;319: 911-1000.

Rashi I, Raymond FH, Li L, Andrih H. Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor

in human alveolar macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1996;141: 84-92.

Rom WN. *Environmental and Occupational Medicine.* 2nd ed.: Little, Brown and Company, 1992.

Stanton M.F. and Wrench C.. Mechanisms of mesothelioma induction. *J. Natl Cancer Inst.*, 1972: 48: 797 -800.

Tilkes F, Beck EG. Macrophage functions after exposure to mineral fibers. *Environ Health Perspect.* 1983; 51: 67 - 72

Raymond FH, Li L, Rashi I, Andrih H. Asbestos induces apoptosis in human alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: 813-819

Wroblewski F, LaDue JS. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1955; 90: 210 - 213