

광물성 섬유유 수산이온기 생성이 흰쥐 폐포대식세포의 세포독성과 적혈구 세포막의 지질과산화에 미치는 영향**

가톨릭대학교 성모병원 산업의학과 · 인하대학교 인하병원 건강관리과*

김경아 · 임 영 · 김지홍 · 장황신 · 박정일 · 윤임중 · 오민화*

— Abstract —

The Effect of Hydroxyl Radical Generation on the Cytotoxicity of Alveolar Macrophage and Lipid Peroxidation of Erythrocyte Membrane by Mineral Fibers

Kyoung Ah Kim, Young Lim, Ji Hong Kim, Hwang Sin Chang, Chung Yill Park, Im Goung Yun, Min Hwa Oh*

*Department of Industrial Medicine, St. Mary's Hospital,
College of Medicine, Catholic University*

*Department of Health Care, Inha General Hospital, Inha University Medical College**

There is some evidence suggesting that the mechanism of pulmonary toxicity of natural fibrous silicate, asbestos, is related to the generation of oxygen-based free radical. Especially the hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$) is believed to be the most reactive one. $\cdot\text{OH}$ is a potent toxic oxidant, $\cdot\text{OH}$ is which means highly cytotoxic, genotoxic and carcinogenic. Nevertheless there has been no previous report about $\cdot\text{OH}$ generation from man-made mineral fibers except asbestos.

In this paper we tested the hypothesis that both cytotoxicity of alveolar macrophage and lipid peroxidation of erythrocytes are associated with $\cdot\text{OH}$ production by mineral fibers in vitro.

The results were as follows:

1. $\cdot\text{OH}$ production in vitro was progressively increased by the concentration dependent pattern with the same mineral fiber. The production of $\cdot\text{OH}$ in vitro by man-made mineral fiber was markedly decreased compared with that of natural mineral fiber except rock wool.

** 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구과제 연구비에 의하여 연구되었음.

2. Lipid peroxidation of mineral fiber-exposed erythrocyte suspension was significantly increased compared with that of phosphate-buffered saline(PBS) control group. Lipid peroxidation in amosite and chrysotile group was larger than that of other mineral fibers.
3. There was a significantly positive correlation between $\cdot\text{OH}$ production in vitro and lipid peroxidation of mineral fiber-exposed erythrocyte.
4. All of mineral fibers were related to the cytotoxicity of alveolar macrophage in concentration-dependent fashion. Chrysotile and amosite were more cytotoxic than crocidolite. Among man-made mineral fibers, ceramic fiber was the most cytotoxic to alveolar macrophage. The viability of alveolar macrophage exposed to asbestos was markedly decreased compared with that of man-made mineral fiber at the same concentration.
5. There was the significant negative correlation between the production of $\cdot\text{OH}$ and the viability of alveolar macrophages.

From these results, we can conclude that the production of $\cdot\text{OH}$ in vitro was strongly correlated with the cytotoxicity of alveolar macrophage and the lipid peroxidation in mineral fiber-exposed erythrocyte. And we documented that man-made mineral fiber could generate $\cdot\text{OH}$ in vitro less than asbestos.

Key words : Mineral fiber, Hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$), Lipid peroxidation, Cytotoxicity

서 론

석면은 자연상태로 존재하는 광물성 섬유(fibrous mineral)로서 섬유성 규산염이며 (fibrous silicate) 뛰어난 내구성, 내열성, 내화성으로 인하여 건축자재나 여러 공업성 물질의 재료로 최근까지 다량으로 사용되었다(김경아, 1995). 그러나 석면에 의한 건강장해가 밝혀지면서 대체물질이 필요하게 되었고 이러한 요구에 따라 여러종류의 인조섬유가 개발되었으며, 1972년 이후부터 그 이용이 점차 증가하고 있다(Rom, 1992). 인조섬유들은 대부분 비정형 규산염(amorphous silicate)을 길이와 너비의 비가 3:1 이상의 섬유형태로 만든 것으로 이에 대한 건강장해는 아직 완전히 규명되지 않은 상태이다(Rom, 1992). 최근에 개발된 인조섬유 뿐 아니라 석면에서도 흡입에 따른 독성효과, 즉 세포독성과 섬유화를 일으키는 기전을 이해하기 위하여 여러 모델들이 제시되고 있는데 분진과 세포의 상호관계에 의한 염증반응, 매개물질, 소화효소, 산소유리기의 분

비 등이 관여하는 것으로 생각되고 있다(Begin 등, 1989). 분진의 길이와 두께와 같은 물리적인 성질(Chang 등, 1988 ; Rom 등, 1991), 폐장 내에서의 내구성(Lippman, 1994), 그리고 분진의 표면 성질(Shi 등, 1988 ; Weitzman 등, 1984)과 광물성 섬유의 화학적인 구성 등(Vallyathan 등, 1992)도 독성발현의 중요한 인자로 인정되고 있다. 석면을 이용한 여러 연구(Bitterman 등, 1986)에 의하면, 석면이 폐장내에 흡입되면 이를 탐식한 대식세포가 탐식된 물질에 의하여 사멸되는 반응이 반복되어 일어나며 이런 반응은 섬유화 변화 및 분진에 의한 폐질환을 잘 일으키는 분진일수록 강력하다. 따라서 분진에 의한 일차적인 세포파괴능과 분진에 의한 폐질환과는 밀접한 관련성이 있을 것으로 생각되고 있는데, 최근 이들 광물성 섬유의 독성에 의한 세포파괴에 산소기(oxygen radical)들이 직접적인 역할을 한다는 연구들(Kamp 등, 1992 ; Vallyathan 등, 1992 ; Schapira 등, 1994)이 많이 발표되고 있다. 산소중 수산이온기(hydroxyl radical, 이하 $\cdot\text{OH}$ 로 약함)가 세포막의 다불포화 지방산을 과산

화시켜 세포를 파괴하고 세포내 DNA의 base modification 또는 strand breakage를 유발하여 유전독성과 발암성 발현을 유발하는 것으로 알려져 있다(Halliwell, 1986).

광물성 섬유에 의한 ·OH 생성능은 섬유형태 분진 입자의 표면성질과 화학적인 구조에 따라 달라질 수 있다. 광물성 섬유 표면의 silanol group과 결합되어 있는 ferric ion이 Fenton반응의 촉매로 작용하여 ·OH생성에 중요한 역할을 한다고 생각되어지고 있으며 Weitzman과 Gracetta은 1984년 석면이 과산화수소수로부터 ·OH을 발생시킬수 있으며, 섬유화성이나 세포독성이 강력할수록 ·OH 생산이 증가되어 있었다고 밝힌바 있다.

최근 석면의 대체물질로 사용되고 있는 인조섬유의 폐독성이나 발암성등은 아직 확실히 밝혀져 있지 않으나 그 사용은 점차 증가하고 있어 이의 유해성 여부 및 정도의 파악이 중요할 것으로 생각되었다. 독성이 강한 분진일수록 실험관내에서 ·OH 생성능이 증가되어 있음으로, 인조섬유의 ·OH 생성능을 알아봄으로서 인조섬유의 폐독성 정도를 추정할 수 있을것으로 생각되었다.

따라서 저자들은 석면과 여러종류의 인조섬유를 포함한 광물성 섬유들의 실험관 내에서의 hydroxyl radical 생성능을 알아보고, 탐식세포에 대한 세포 독성과 세포막의 과산화 정도와 비교함으로써 석면과 인조섬유의 독성 기전을 비교해보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 광물성 섬유

1) 석면과 그농도

모든 석면은 日本作業環境測定協會에서 표준화한 시료를 입수하여 사용하였다. 사용된 석면의 길이를

Table 1. Number of fiber of mineral fiber

Type of mineral fiber	Number of fiber/ μg
Crocidolite	60,015.8
Amosite	85,603.9
Chrysotile	86,999.6
Rock Wool	2,093.6
Ceramic fiber	9,770.0
Glass wool	23,186.1

일정하게 하기위하여 침강방법(Sedimentation method)으로 분류하여 사용하였다. 침강방법은 wide-mouth bottle에 석면과 증류수를 넣고 2시간 동안 초음파 처리(sonication) 하고 24시간 방치하였다가 침강정도에 따라 섬유를 분리하여 섭씨 50도에서 완전히 물기를 증발시킨 후 섬유를 굵어서 사용하였다.

석면섬유 그램당 섬유수를 측정하기 위하여 pore size가 $0.8\mu\text{m}$ 인 cellulose ester membrane filter를 vaccum filter system에 연결하여 적정한 농도로 희석한 석면섬유 현탁액 1ml를 여과시킨 후 95% ethanol로 세척하였다. membrane filter를 건조시킨 후 slide glass 위에 acetone vapor로 고정하였다. 석면섬유는 Walton-Beckett graticule이 삽입된 위상차현미경으로 400배 배율에서 주의깊게 관찰하여 μg 당 섬유수로 환산하였고 석면섬유의 길이도 같이 측정하였다. 석면섬유의 μg 당 섬유수는 Table 1에서 보는바와 같이 crocidolite 60,015.8 f/ μg , amosite 85,603.9 f/ μg 그리고 chrysotile은 86,999.6 f/ μg 이었다. 석면 길이의 기하 평균±기하표준편차는 crocidolite $12.1\pm 1.7\mu\text{m}$, amosite $12.1\pm 1.9\mu\text{m}$, chrysotile $23.1\pm 1.8\mu\text{m}$ 이었다.

2) 인조섬유

인조섬유는 Japan Industrial Safety & Health Association(JISHA)에서 표준화 된 것을 입수하여 사용하였다. 실험에 사용된 인조섬유는 glass fiber, rock wool, ceramic fiber이었으며 인조섬유 μg 당 섬유수와 길이는 석면 섬유 처리시와 같은 방법으로 측정하였다. 각각의 인조섬유별 섬유수는 glass fiber

Table 2. Size distribution of mineral fibers

Type of mineral fiber	length of fiber	Range
Crocidolite	12.1 ± 1.7	5-31
Amosite	12.1 ± 1.9	5-40
Chrysotile	23.1 ± 1.8	5-33
Rock wool	20.5 ± 1.6	5-50
Ceramic fiber	21.1 ± 1.7	6-58
Glass fiber	13.7 ± 1.7	7-23

Geometric mean±Geometric standard deviation

가 μg 당 23,186.1개, rock wool 2,093.6 f/ μg , ceramic fiber는 9,770.0 f/ μg 이었다. 그리고 길이의 기하 평균±기하표준편차는 각각 glass fiber $13.6\pm 1.7\mu\text{m}$, rock wool $20.5\pm 1.6\mu\text{m}$, 그리고 ceramic fiber는 $21.1\pm 1.7\mu\text{m}$ 이었다.

2. 실험관내에서 $\cdot\text{OH}$ 생성능

유리 실험관에 deoxyribose 1.0mM, hydrogen peroxide 1.0mM, ascorbate 1.0mM, 그리고 농도별로 준비된 광물성 섬유를 넣고 37°C 에서 30분간 배양한후 1,200 g서 10분간 원심분리하였다. 광물성 섬유의 농도는 10, 50, 100, 500 μg 으로 준비하였다. 원심분리 한 상층액 1ml를 주의깊게 채취하여 1.0% thiobabituric acid(TBA, Sigma, USA) 1ml와 2.8% trichloroacetic acid(TCA, Sigma, USA) 1ml를 넣고 섞어 100°C 에서 10분간 반응시킨후 얼음속에 넣어 냉각시켰다. spectrophotometer로 532 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 분진 및 농도별로 시료를 5개 준비하여 측정하였다.

3. 적혈구에 의한 초과산화 이온 생성능

2% 적혈구 2ml와 succinylated ferricytochrome C 80 μM 을 잘 섞고 SOD가 있거나 없는 각각의 조건에서 37°C , 60분간 배양한후 원심분리하여 550

nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. SOD유무에 따른 흡광도의 차이를 extinction coefficient($21.0 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)로 나누어 초과산화이온의 생산량을 측정하였다(nM superoxide/hr). 시료는 5배수로 준비하여 측정하였다.

4. 광물성 섬유에 폭로된 적혈구의 lipid peroxidation

2% 적혈구 2ml에 광물성 섬유가 ml당 1mg이 되도록 넣고 12시간동안 배양한 후 TBA, TCA 그리고 0.01% butylated hydroxytoluene을 넣고 20분동안 가열하였다. 2000 g로 원심분리한 후 상층액내 malondialdehyde농도를 532 nm파장에서의 흡광도로 측정하였다. 모든 시료는 5개 준비하여 측정하였다.

5. 광물성 섬유에 의한 폐포대식세포의 세포독성

흰쥐(Sprague-Dawley)의 폐포대식세포를 분리하여 여러 농도(10, 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 섬유형 분진으로 자극하고 24시간 배양후 배양판(culture plate)에 붙어있는 폐포대식세포의 생존율을 trypan blue exclusion 검사로 측정하였다. 세포를 400개까지 센후 죽어있는 세포의 백분율을 세포독성의 상대적 지표로 하였다.

6. 통계학적 검정

광물성 섬유의 길이에 관한 자료는 기하평균±기하표준편차로 표시하였고 그외의 모든 변수는 평균±표준편차로 나타내었다. 대조군과 각 광물성섬유분진군간의 차이는 Student's t-test로 분석하였고 광물성 섬유분진군 사이의 차이는 ANOVA와 Scheffe's multiple comparison test를 이용하여 분석하였다.

성 적

1. 실험관 내에서 광물성 섬유의 $\cdot\text{OH}$ 생성능

실험관내 무세포 상태에서 광물성 섬유의 종류별 농도에 따른 $\cdot\text{OH}$ 생성능은 Fig. 1과 같다. 광물성 섬유의 종류가 같은 경우 광물성 섬유의 농도가 증가할수록 실험관내에서의 $\cdot\text{OH}$ 생산이 증가하였다. 석면의 농도가 같은 경우 $\cdot\text{OH}$ 생산량이 amosite > crocidolite > chrysotile의 순이었으나 유의한 차이

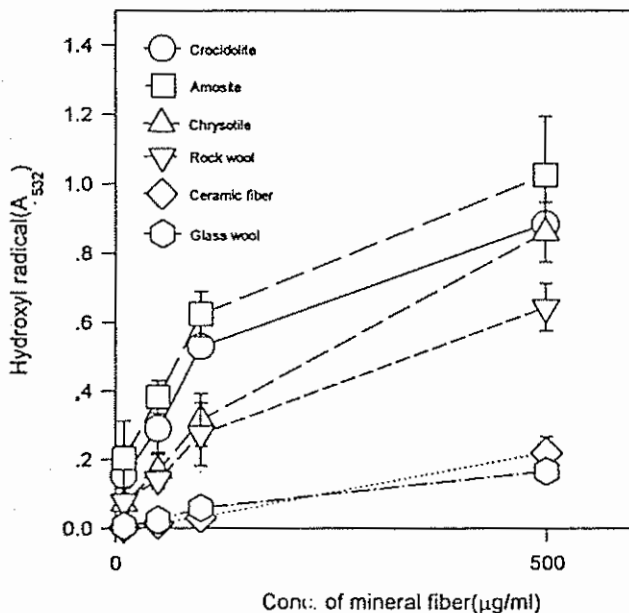


Fig. 1. Hydroxyl radical production in vitro according to type and concentration of mineral fiber

는 아니었다. 섬유유 농도가 같을 때 석면보다는 인조섬유에서 실험관내의 ·OH 생산량이 감소되어 있었다. 그러나 rock wool은 섬유유 amosite와 crocidolite보다는 ·OH생산량이 감소되어 있었으나 chrysotile과는 차이가 없었다.

2. 적혈구에 의한 초과산화이온 생성능과 광물성 섬유유에 의한 적혈구막의 지질과산화

체내에서의 ·OH는 세포막을 지질과산화시켜 세포막을 파괴하는 점에 착안하여 적혈구를 이용하여 광물성 섬유유에 의해 발생된 ·OH에 의한 지질과산화 정도를 정량하였다. 산화 헤모글로빈은 자가산화에 의하여 초과산화이온과 과산화수소가 생성되므로 광물성 섬유유와 반응하여 ·OH에 의한 지질 과산화가 일어나게 된다. 이런반응을 보기전에 적혈구에서 초과산화이온 생성능을 cytochrome with SOD inhibitable reduction 방법에 의하여 알아본 바 2% 적혈구 1ml당 시간당 2.2 μM의 초과산화이온이 생성되고 있었다.

광물성 섬유유에 의한 적혈구막지질 과산화의 정도는 malondialdehyde의 농도를 측정하여 정량하였다(Table 3). 모든 광물성 섬유유에서 인산완충액 대

조균에 비하여 지질과산화가 증가되었다. 다른 광물성 섬유유들과 비교하였을 때 chrysotile과 amosite에서 유의하게 증가되었다.

광물성 섬유유에 의한 ·OH 생성능이 증가할수록 적혈구막의 지질과산화가 증가하는 유의한 양의 상관관계가 있었다($r=0.62, p=0.002$ Fig. 2).

3. 광물성 섬유유에 의한 세포독성

광물성 섬유유의 종류와 농도에 따른 세포생존율의 변화는 Fig. 3과 같다.

모든 광물성 섬유유에서 섬유유의 농도가 증가할수록 세포 생존율이 감소하였다. 자연산 광물성 섬유유 즉 3종류의 석면군에서 자극한 석면 농도가 500 μg/ml 일때 세포생존율이 crocidolite군 66.6±6.1%, amosite 군 64.2±1.3%, 그리고 chrysotile군은 64.2±8.9%로 차이가 없었으나 석면농도가 50과 100μg/ml 일때 chrysotile(79.6±4.8%, 73.4±1.7%)과 amosite (81.4±1.6%, 76.7±1.6%)에 의한 세포독성이 crocidolite(88.4±2.1%, 80.1±3.3%)보다 증가되어 있었다.

인조섬유에서는 섬유유의 농도가 같은 경우 10, 50, 100μg/ml에서는 차이가 없었으나 최고농도인 500μg으로 자극하였을 때 rock wool은 87.3±0.8%, glass fiber는 89.4±1.1% 이었던 것에 비하여 ceramic fiber로 자극후 세포생존율은 79.6±4.3%로 감소되어 있어 ceramic fiber에 의한 세포독성이 증가되어 있었다.

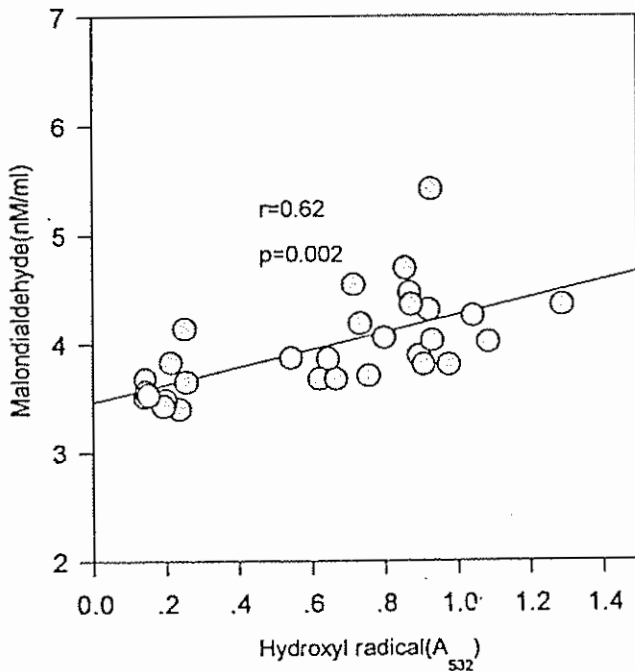


Fig. 2. Correlation between hydroxyl radical production by mineral fiber in vitro and lipid peroxidation in mineral fiber-exposed erythrocyte suspension.

Table 3. Lipid peroxidation in mineral fiber-exposed erythrocyte suspension

	Malondialdehyde (nM/ml)	Scheffe Grouping
Control (PBS)	3.39±0.13	
Crocidolite	3.99±0.21*	A**
Amosite	4.09±0.31*	B
Chrysotile	4.66±0.45*	B
Rock Wool	3.85±0.21*	A
Ceramic fiber	3.73±0.30*	A
Glass wool	3.52±0.06*	A

* : P<0.05 compared to PBS control

** : Multiple comparison test (Means with the same letter are not significantly different at the 0.05 level)

고찰

세포막의 지질과산화 산물인 malondialdehyde가 증가할수록 생존세포수가 감소하는 유의한 음의 상관관계를 보였으며 그상관계수는 $r=-0.52$ ($p=0.0035$)이었다(Fig. 4).

광물성 섬유에 의한 $\cdot\text{OH}$ 생성능이 증가할수록 광물성섬유 자극후 폐포대식세포의 생존율이 감소하는 유의한 음의 상관관계를 보였다($r=-0.68$, $p=0.001$, Fig. 5).

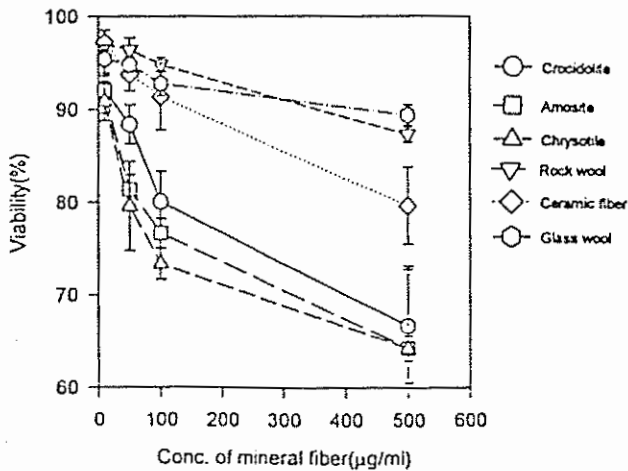


Fig. 3. Alveolar macrophage viability according to the type and concentration of mineral fiber

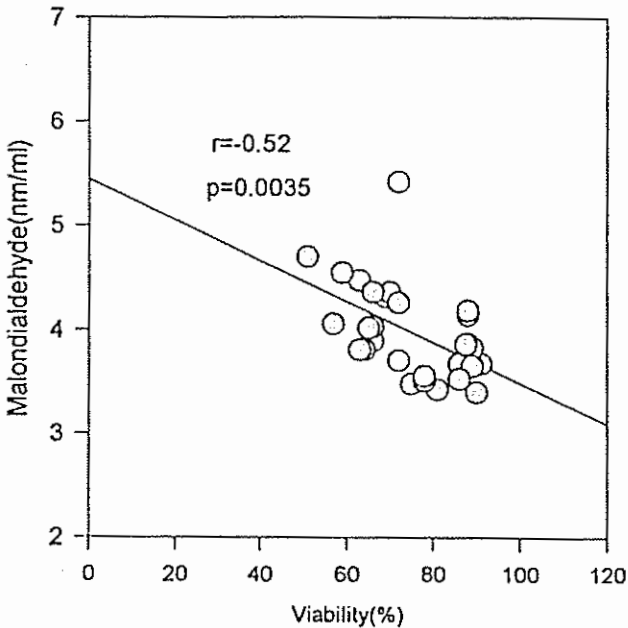


Fig. 4. Correlation between viability of alveolar macrophage stimulated with various mineral fibers and lipid peroxidation in mineral fiber-exposed erythrocyte suspension

석면은 절연성, 불연성, 유연성, 산이나 알칼리에 대한 저항성등 특징적인 성질을 갖고 있어 20세기 들어 공업화 되면서 다량으로 사용되다가 석면에 의한 심각한 건강장애가 밝혀지면서 현재는 여러 가지 인조섬유들로 대체되고 있는데(김경아, 1995) 이들 인조섬유에 의한 독성효과가 확실히 밝혀져 있지 않음에도 불구하고 점차 사용이 증가하고 있다.

석면과 인조섬유는 모두 섬유형 규산염(fibrous silicate)으로(Rom, 1992) 규산염 분진에 의한 세포파괴 및 폐독성에는 산소기가 중요한 역할을 하는 것으로(Vallyathan 등, 1992 ; Schapira 등, 1994) 생각되고 있다. 생리적으로 반응성 산소기는 세포대사와 산화 환원 반응의 정상적인 생성물로서, 폐세포들은 이들 산소기의 독성에 대해 방어할 수 있는 체계를 갖추고 있다(Vallyanthan 등, 1992). 그러나 직업적으로 반복해서 분진에 폭로되는 경우 반복된 탐식작용을 일으키고 분진독성에 의한 탐식세포의 파괴 및 반응성 산소기를 가지고 있는 분진의 탐식에 의하여 산소기 및 그 대사물질의 생산을 과량으로 증가시킨다(Vallyathan 등, 1992). 이와

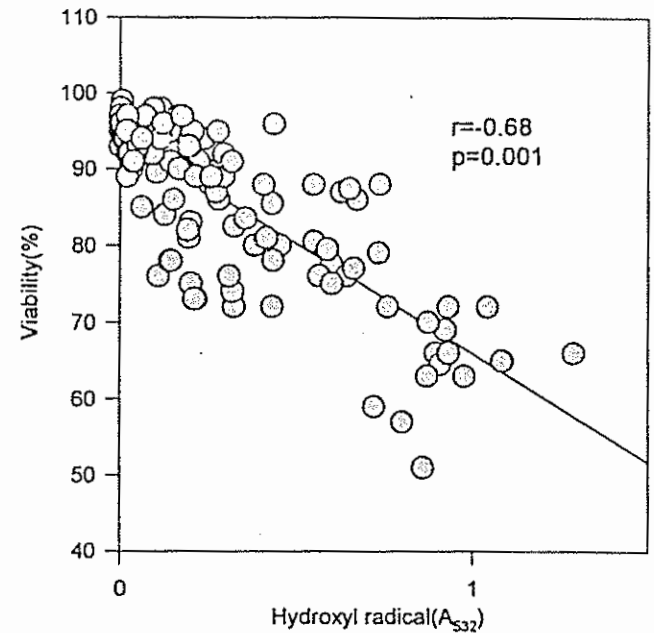
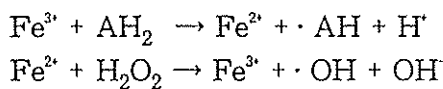


Fig. 5. Correlation between hydroxyl radical production by mineral fiber and viability alveolar macrophage stimulated with various mineral fiber.

같은 분진 탐식의 결과로서 발생한 산소기의 생산의 증가는 세포의 방어기전을 손상시키고 결과적으로 세포파괴를 가져온다(Mossman 등, 1983; Shatos 등, 1987; Donaldson 등, 1985). 특히 이들 반응성 산소기종 ·OH이 가장 반응성이 크며 강력한 세포독성 (cytotoxic)과 유전자 독성 (genotoxic)을 갖는다 (Cochrane, 1991; Imlay 등, 1988). 규산분진에서 ·OH의 생성은 ferric ion과 결합되어 있는 분진표면의 silanol(Si-OH)군과 관련되어 있을 가능성이 많다(Schapira 등, 1995). 규산분진 표면에 복합체를 이루고 있는 ferric ion(Fe³⁺)은 유리규산이나 규산염 분진이 fenton 촉매제로 작용하게 하며 결과적으로 Fenton 반응에 의한 전자전달(electron exchange)에 의하여 과산화수소로부터 ·OH을 생성시킨다(Kennedy, 1989).

즉 광물성 섬유가 폐장내로 흡입되면 생체내에서는 respiratory burst에 의하여 초과산화이온(O₂⁻)과 과산화수소(H₂O₂)가 생산되고 그중 초과산화이온이 환원제로 작용하여 Fe³⁺에서 Fe²⁺상태로 만들게 되며 이 Fe²⁺와 반응한 H₂O₂는 전자를 하나 수용하면서 환원되어 빠른속도로 H₂O₂에서 ·OH로 분해되게 된다(Halliwell과 Gutteridge, 1986).

본실험에서는 이와같은 가설에 근거하여 세포가 없는 상태에서 광물성 섬유들이 hydroxy radical을 생산하는 정도를 측정하였다. 생체내에서는 Fe²⁺상태로 만드는 환원제로 작용하는 초과산화이온(O₂⁻)대신에 ascorbate(AH₂)를 사용하여 섬유형분진이 H₂O₂에서 hydroxy radical을 생성시키는 능력을 실험하였는데(Kennedy 등, 1988), 이상을 반응식으로 표시하면 다음과 같다.



이때 발생된 ·OH은 deoxyribose의 TBA반응 생성물을 측정함으로써 정량하였는데 deoxyribose로부터 TBA반응 생성물이 산소유리기중 특히 ·OH에 의하여 매개되는 것으로 알려져있기 때문이다(Schapira 등, 1995).

앞에 기술된 반응식에서 예상할수 있듯이 무세포상태에서 광물성 섬유의 ·OH 생성능은 광물성 섬유의 철함유량에 따라 큰 영향을 받는다(Vallythan

등, 1992). 본연구에 사용된 광물성 섬유들을 제공해준 기관에서 분석한 자료에 따르면 crocidolite 18%, amosite 34%, chrysotile 1%, rock wool 0.4%, ceramic fiber 0.15%, 그리고 glass wool은 0.07%의 철을 함유하고 있어 ·OH 생성능은 amosite에서 현저하게 클것으로 예상되었으나 실험결과 광물성 섬유의 철 함량이 높은 amosite에서 ·OH 생성능이 가장 높았으나 다른 석면들과 유의한 차이는 아니었다. ·OH 생산에 철함량이 큰영향을 끼칠지라도 섬유의 두께나 길이와 같은 물리적 성질이나 섬유의 redox potential site도 중요한 인자가 될 수 있음으로 물리적 성질을 일정한 범위가 되도록 처리하였으나 동일한 조건이 되게 하는데는 기술적인 어려움이 있어 던바 이들의 영향을 배제할수 없었다.

광물성 섬유는 적혈구에 표면 정전력에 의하여 결합한 후(surface electrostatic attachment) 적혈구막을 파괴시키는데 이는 광물성 섬유가 Fenton반응 촉매제로 작용하여 생산된 ·OH 때문으로 생각되고 있다. 산화 헤모글로빈(oxyhemoglobin)은 자가산화(autooxidation) 반응으로 (Hb²⁺+O₂→Hb³⁺+O₂⁻; 2H⁺+O₂⁻+Hb²⁺+O₂→Hb³⁺+O₂+H₂O₂) ·OH 생성을 위하여 필요한 초과산화이온과 과산화수소를 제공할 수 있다.

과산화수소는 자유롭게 세포막을 통과하고 O₂⁻ anion channel을 통해 빠르게 적혈구막을 통과할 수 있어 분진 폭로 후 respiratory burst와 마찬가지로 적혈구로부터 초과산화이온과 과산화수소가 풍부하게 생성되므로 적혈구를 이용하여 광물성 섬유에 의한 ·OH 생성과 이에 의한 lipid peroxidation을 알아 볼 수 있었다.

세포막의 불포화지방산 또는 지방은 산소유리기, 특히 ·OH에 의하여 과산화되면 세포막이 파괴되면서 과산화산물이 증가된다. 불포화지방산이나 지방이 과산화되면 일차적으로 hydroperoxide가 생기고 이것이 분해되서 aldehyde, ketone, alcohol, hydrocarbon, ester, furan 그리고 lactone등이 생긴다. malonaldehyde는 hydroperoxide의 중요한 분해산물로서 malonaldehyde의 측정이 lipid peroxidation의 편리한 지표로 알려져있다. 따라서 본연구에서도 광물성 섬유에 의한 적혈구막의 지질 과산화 정도를 malondialdehyde의 양을 측정함으로써 정량하였다.

amosite에 의하여 적혈구막의 지질과산화가 증가함은 Kennedy(1989)들에 의하여 발표되나 있으나 인조섬유에 대한 자료는 아직 연구된바 없어 비교할 수 없었다. 그러나 본 실험에 사용된 3가지 인조섬유(rock wool, ceramic fiber, glass fiber)에 의한 적혈구 막의 지질과산화가 분진을 넣지 않은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며 chrysotile이나 amosite보다는 낮았으나 crocidolite와는 별 차이가 없었다. crocidolite의 강력한 섬유화성과 발암성을 생각해 볼 때 대체물질로 사용되고 있는 인조섬유의 독성에 관한 포괄적인 연구를 필요로 한다고 생각된다.

·OH을 생산하는 능력이 많은 분진 일수록 세포 파괴능, 유전독성(genotoxicity), 그리고 발암성(carcinogenicity)이 크다고 할 수 있다. 본 실험 결과 실험관내에서 광물성 섬유에 의한 ·OH 생성능이 클수록 광물성 섬유와 반응시킨 폐포대식세포의 세포생존율이 감소하여 ·OH이 광물성 섬유에 의한 세포독성에 중요한 영향을 미치는 것으로 생각되었다. 인조섬유중 rock wool의 ·OH 생성능이 가장 컸으나 세포독성은 ceramic fiber에서 가장 높았고, 석면중 amosite의 ·OH 생산능이 가장 컸으나 세포독성은 섬유광물성 섬유의 농도가 같을 때 amosite군에서 crocidolite군보다는 컸으나 chrysotile군과는 차이가 없었던 것으로 미루어 세포독성을 ·OH 발생만으로 이해할수는 없었다. 이를 설명할수 있는 것으로는 첫째 무세포 상태에서의 ·OH 생성능은 분진과 탐식세포의 반응에 의하여 동일량의 초과산화 이온과 과산화수소가 생산된다고 가정하였을 때 ·OH생성능을 본 것이나 실제 탐식세포와 광물성섬유 분진과의 반응에 의한 초과산화 이온과 과산화수소의 생성은 차이가 있을수 있다. 따라서 실제 생체내에서나 혹은 실험관내에서 탐식세포와 광물성 섬유분진과의 반응에 의한 산소기생산 정도에 관한 연구가 필요할 것이다. 둘째 세포독성에는 섬유의 길이나 숫자도 중요한 영향을 미치므로 석면중 chrysotile의 μg 당 섬유수가 가장 많았고 평균 섬유길이가 crocidolite와 amosite에 비하여 2배 가량 되었으며 인조섬유에서도 ceramic fiber가 rock wool에 비하여 평균 섬유길이는 차이가 없었으나 μg 당 섬유수가 약 3배 가량 인 것이 높은 섬유독성의 원인으로 작용하였을 것으로 생각되었다.

자연적으로 존재하는 섬유형 규산염분진인 석면에 의한 세포독성에 산소유리기가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들 산소유리기중 hydroxy radical($\cdot\text{OH}$)이 가장 반응성이 크고 강력한 산화제로 세포독성, 유전자 독성 및 발암성에 관여한다. 석면이 실험관내에서 ·OH을 생성해내며 실험관내 ·OH 생성량과 세포독성과의 인과관계가 이미 밝혀져 있지만 최근 석면의 대체물질로 사용되고 있는 인조섬유의 ·OH 생성능에 관하여는 알려진바 없다.

따라서 인조섬유를 포함한 광물성 섬유의 실험관내 ·OH 생성능과 폐포대식세포의 세포독성, 적혈구막의 지질 과산화와의 관련성을 알아보고자 하였는데 그결과는 다음과 같다.

1. 광물성 섬유의 종류가 같은 경우 농도가 증가할수록 실험관내에서의 ·OH 생산이 증가하였다. 농도가 같은 경우 ·OH 생산량은 amosite>crocidolite>chrysotile의 순이었으나 유의한 차이는 아니었다. 섬유의 농도가 같을 때 석면 보다는 인조섬유에서 실험관내의 ·OH 생산량이 감소되어 있었다. 그러나 rock wool은 chrysotile과 비슷한 수준의 높은 ·OH을 나타냈다.
2. 모든 광물성 섬유군에서 인산완충액 대조군에 비하여 지질 과산화가 증가되었으며 특히 chrysotile과 amosite에서 가장 높았다.
3. 광물성 섬유에 의한 ·OH 생성능이 증가할수록 적혈구막의 지질과산화가 증가하는 유의한 양의 상관관계가 있었다.
4. 광물성 섬유의 농도가 증가할수록 폐포대식세포의 생존율이 감소하였다. 석면중에서는 chrysotile과 amosite에 의한 세포독성이 crocidolite보다 증가되어 있었으며 인조 섬유 중에서는 ceramic fiber에 의한 세포독성이 가장 컸다.
5. 광물성 섬유에 의한 ·OH 생성능이 증가할수

록 광물섭유 자극후 폐포대식세포의 생존율이 감소하였다.

이상의 결과로 보아 실험관내에서 $\cdot\text{OH}$ 생성능이 증가할수록 세포파괴와 지질과산화가 증가하였으며 인조섬유에서도 석면보다도 약한 정도이지만 $\cdot\text{OH}$ 생성능이 증가하였고 특히 rock wool의 경우 chrysotile과 유사한 반응을 보였다.

REFERENCES

- 김경아. 석면관련 질환과 폐장내 잔류 석면. 한국의 산업의학 1995;34(3):75 - 79.
- Begin R, Cantin A, Masse S. Recent advances in the pathogenesis and clinical assessment of mineral dust pneumoconioses ; asbestosis silicosis and coal pneumoconiosis. Eur Respir J. 1989;2:988-1001.
- 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.
- Chang LY, Overby LH, Brody AR, Crapo JD. Progressive lung cell reactions and extracellular matrix production after a brief exposure to asbestos. Am J Pathol 1988;131:156-170.
- Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. Am J Med 1991;91(Suppl 3C):23s-30s.
- Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science 1988;240:1302-1309.
- Dalal NS, Shi X, Vallyathan V. Role of free radicals in the mechanisms of hemolysis and lipid peroxidation by silica: comparative EST and cytotoxicity studies. J Toxicol Environ Health 1990;29:307-316.
- Donaldson K, Shought J, Hannant D, Bohon RE. Increased release of hydrogen peroxide and superoxide anion from asbestos primed macrophage. Inflammation 1985;9:139-147.
- Freeman BA, Crapo JD. Free radicals in tissue injury. Lab invest. 1982;47:412-426.
- Fridovich I, Freeman BA. Antioxidant defense in the lung. Am Rev Physiol 1986;48:693-702.
- Gutteridge JMC, Richmond R, Halliwell B. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. Biochem J 1979;184:469-472.
- 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.
- 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.
- Kennedy TP, Dodson R, Rao NV, Ky H, Hopkins C, Baser M, Tolley E, Hoidal JR. Dusts causing pneumoconiosis generate $\cdot\text{OH}$ and produce hemolysis by acting as Fenton catalysts. Arch Biochem Biophys 1989;228:373-376.
- Lippamann M. Deposition and retention of inhaled fibres: effects on incidence of lung cancer and mesothelioma. Occup Environ Med 1994;51:793-798.
- Mossman BT, Marsh JP, Shatos MA. Alteration of superoxide dismutase activity in tracheal epithelial cells by asbestos and inhibition of cytotoxicity by antioxidants. Lab Invest. 1986;54:204-212.
- Rom WN, Travis WD, Brody AR. Cellular and molecular basis of the asbestos-related diseases. Am Rev Respir Dis 1991;143:408-422.
- Rom WN. Environmental and Occupational Medicine. 2nd ed.: Little, Brown and Company, 1992.
- Schapiro RM, Ghio AJ, Effros RM, Morrissey J, Dawson 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.
- Schapiro RM, Ghio AJ, Effros RM, Morrissey J, Almagro 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
- Shatos MA, Doberty JM, Marxh JP, Mossman BT. Prevention of asbestos induced cell death in rat lung fibroblasts and alveolar macrophages by scavengers of active oxygen species Environ Res 1987;44:103-116.
- Si X, Dalal NS, Vallyathan V. ESR evidence for the hydroxyl radical formation in aqueous suspension of quartz particle and the possible significance to lipid peroxidation in silicosis. J Toxicol Environ Health 1988;25:237-245

Vallyanthan V, Shi X, Dalal NS, Irr W, Castranova V. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138:1213-1219.

Vallyathan V, Mega JF, Shi X, Dalal NS. Enhanced generation of free radical from phago-

cytes induced by mineral dusts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992;6:404-413.

Weitzman SA, Gracfla P. Asbestos catalyzes hydroxyl and superoxide radical generation from hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 1984;228:373-376.