

대도시의 입자상 물질이 A549와 RAW 264.7 세포에 미치는 영향

박영만, 김지홍, 김경아, 노철언¹⁾, 김형중²⁾, 임 영

가톨릭대학교 성모병원 산업의학과, 한림대학교 화학과¹⁾, 연세대학교 의과대학 내과학교실²⁾

Effects of Particulate Matters on A549 and RAW 264.7 Cells

Young Mann Baak, Ji Hong Kim, Kyoung Ah Kim, Chul Un Ro¹⁾, Hyung Jung Kim²⁾, Young Lim

Department of Occupational and Environmental Medicine, St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea; Department of Chemistry, Hallym University¹⁾; Department of Internal Medicine, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea²⁾

Objectives : To investigate the effects of particulate matter (PM), a marker of environmental pollution derived from combustion sources, on lung epithelial cells (A549) and macrophage (RAW 264.7).

Methods : The production of reactive radicals from lung cells, the lipid peroxidation of cell membrane, and the cytotoxicity of PM were measured using an in vitro model. The results were compared with a control group.

Results : The presence of PM significantly increased the production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species with time and in a dose dependent pattern and also increased the malondialdehyde concentration in lung epithelial cells. The cytotoxicity of PM was

increased with increasing concentration of PM.

Conclusions : It has been suggested that urban particulate matter causes an inflammatory reaction in lung tissue through the production of hydroxyl radicals, nitric oxides and numerous cytokines. The causal chemical determinant responsible for these biologic effects are not well understood, but the bioavailable metal in PM seems to determine the toxicity of inhaled PM.

Korean J Prev Med 2001;34(1):41-46

Key Words: Environmental pollution, Epithelial cells, Macrophages

서 론

대도시의 공기오염을 일으키는 주요 인으로는 오존, 일산화탄소, 유황 산화물, 질소 산화물, 입자상 물질(particulate matter, PM) 등이 있다. 그 중 입자상 물질은 호흡기에 대한 자체의 독성뿐 아니라 자극성 가스를 흡착하여 폐의 심부까지 침입하여 가스의 유해성을 높이는 등의 영향으로 최근 관심이 집중되고 있다. 입자상 물질 중 크기가 10 μ 이상인 것은 자연적으로 지표로부터 형성되며, 10 μ 이하(PM₁₀)의 입자상 물질은 각종의 연소 과정이나 공업생산 과정에서 배출된

다. 0.5~5.0 μ 의 입자들은 폐포를 통하여 흡입되어 혈관이나 임파관 내로 침투하기 때문에 그 성분이 문제가 되는데 석면, 연, 카드뮴, 수은, 망간, 베릴륨, 바나듐, 니켈 등의 화합물과 발암물질로서 가솔린 및 디젤엔진의 배기 중에 포함되어 있는 3,4-benzopyrene이 중요시되고 있다.

입자상 물질의 독성에 대하여 세계적으로 많은 연구가 시작되면서 미국에서는 1987년부터 분진의 크기가 10 μ 이하인 PM₁₀의 규제농도를 입법화(연간 50 μ g/m³, 24시간 150 μ g/m³)하였고, 1997년에는 분진의 크기가 2.5 μ 이하인 PM_{2.5}의 기준을 연간 15 μ g/m³, 24시간 65 μ g/m³로 정하였다(McClellan, 1998). 이는 PM_{2.5}가 각종 에너지의 연소와 화학반응 등 산업화와 관련하여 인간의 활동이 늘어나면서 계속 그 발생량이 증가하는 등 대기과 건강에 미치는 영향도 심각해지고 있기 때문이다.

PM₁₀이 사망률의 증가와 관련이 깊다는 것은 알려져 있고(Devlin, 1998; Lioy & Zhang, 1999), 최근 심폐질환으로 인한 입원율에 PM_{2.5}가 PM₁₀보다 2배 이상 높은 상관관계가 있다고 보고되었는데 이는 PM_{2.5}가 혈액점도를 높이기 때문인 것으로 알려졌다(Peters et al., 1997).

입자상 물질은 여러 가지 유기물과 무기물의 복합체로 그 구성 성분이 시간과 장소에 따라 다르게 모양과 크기도 일정치 않으나 일반적으로 단일 고형입자

접수 : 2000년 9월 15일, 채택 : 2000년 11월 20일

본 연구는 보건복지부 보건과학기술연구사업 HMP-99-M-09-0005 연구비로 일부 수행되었음.

책임저자 : 임영 (가톨릭대학교 성모병원 산업의학과, 전화번호 : 02-3779-1401, 팩스번호 : 02-785-0556, e-mail : ngiim@cmc.cuk.ac.kr)

(discrete solid particle) 내지 연쇄상 입자 (agglomerated chains of particle), 또는 분산 액상 입자(dispersed liquid droplet) 상태로 존재한다. 역학조사에서 입자상 물질이 사망률과 이환율을 높인다는 것은 알려졌지만 구체적으로 어떤 구성 성분이 이러한 영향의 원인인지는 밝혀지지 않았다. 현재까지는 입자의 크기, 산도, 금속 성분, 유기물질이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며(Devlin, 1998), 최근 금속 성분이 이온화된 전환 금속(transition metal)으로서 반응성 유리기 생산을 통한 폐의 염증에 깊숙이 관여한다는 주장이 있어 이 분야에 대한 연구가 활발하다(Ghio et al., 1996; Dreher et al., 1997).

본 연구에서는 폐장을 구성하는 여러 세포 중 분진의 탐식작용에 주로 작용하는 폐포 대식세포와 폐의 표면에 분포하여 독성물질의 영향을 주로 받게되는 상피세포가 대도시의 입자상 물질에 노출되었을 때 일어나는 변화 중 반응성 산소기 및 질소기의 분비, 지질과산화, 세포독성 등을 측정하여 입자상 물질이 호흡기 세포에 미치는 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 분진

입자상 물질(urban particulate matter)로 미국의 National Institute of Standard & Technology(Geithersburg, MD)에서 제공하는 미주리주 세인트루이스 지역(SRM #1648)과 수도 워싱턴 지역(SRM #1649)의 도시분진을 이용하였다. 본 실험에 사용된 두 가지 입자상 물질의 금속 성분을 포함한 물리화학적 특성을 Costa와 Dreher(1997)는 다음과 같이 분석하

였다(Table 1).

양성 대조분진으로 이산화규소(Min-U-Sil, Pennsylvania Glass Sand Corp., Pittsburgh, PA)를, 음성 대조분진으로 이산화티탄(Sigma, St Louis, MO)을 사용하였다. 모든 분진은 실험에 사용하기 전에 고압 멸균하였으며 배지에 섞어 1시간 초음파 처리 후 사용하였다.

2. 세포 배양

사람의 폐 상피세포암에서 분리된 폐 상피세포주인 A549(ATCC CCL 185, Rockville, MD) 세포, 그리고 폐포 대식세포와 생물학적 성상이 유사한 단핵세포주인 RAW 264.7(ATCC TIB 71, Rockville, MD) 세포를 이용하였다.

3. 폐 상피세포(A549 cell)의 반응성 산소유리기와 반응성 질소유리기 측정

1) 과산화수소(H₂O₂)

입자상 물질로 자극된 폐 상피세포에서 생산되는 반응성 산소유리기 중 과산화수소를 측정하였다. 상층액에 염산을 넣고 잘 섞은 후 10 mM 황산제1철암모늄(ferrous ammonium sulfate) 20 μl와 2.5 M 타이오청산칼륨(potassium thiocyanate) 30 μl을 가하고 10분간 반응시켜 495 nm에서 흡광도를 측정하고, 과산화수소 표준곡선으로 농도를 환산하였다(Heinzel et al., 1992).

2) 아질산염(Nitrite)

폐 상피세포(A549 cell)를 1×10⁶개/well이 되도록 6-well plate에 분주하고 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 세포가 well에 90% 정도 차기를 기다렸다가 성장인자가 제거된 배지로 갈아주고 48시간 동안 더 배양하였다. 48시간 후 세

포를 배지로 세척한 후 입자상 물질을 농도별로 분주하였다. 이때 입자상 물질의 농도는 5, 50, 500 μg/cm²으로 하였으며, 입자상 물질로 자극하고 1, 6, 24시간 후 각 세포로부터 반응성 질소유리기 생산량을 아질산염으로 정량하였다. 실험은 각 군별로 5배수로 준비하여 시행하였다. 배양이 끝난 후 상층액을 거두어 10,000 rpm에 10분간 원심 분리한 후 입자상 물질을 제거한 상층액에서 아질산염을 측정하였다. 배양관에 남아있는 세포는 지질과산화를 정량하는데 이용하였다(Moshage et al., 1995).

4. 세포의 지질과산화

아질산염을 측정하기 위하여 상층액을 거둔 뒤 남아있는 세포를 phosphate buffered saline(PBS, Sigma, St Louis, MO)으로 세척하였다. 각 well에 3차 증류수 1 ml을 가하고 얼렸다 녹이는 것을 반복하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해액의 상층액 0.5 ml에 1% 타이오바르비투르산(thiobarbituric acid) 0.5 ml와 2.4% 삼염화초산(trichloroacetic acid) 0.5 ml를 가하고 100℃에서 10분간 반응시킨 후 즉시 얼음 사이에 넣었다. 532 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선에 의하여 말론다이알데하이드(malondialdehyde, MDA)를 계산하여 지질과산화 정도를 정량하였다(Kim et al., 1997).

5. 세포독성

1) 폐 상피세포(A549 cell)에 대한 독성 측정

96-well plate에 폐 상피세포를 well당 1×10⁴ 개가 되도록 분주하고 24시간 배양한 후 2회 세척한 뒤 입자상 물질이 포함되거나 포함되지 않은 배지로 갈아주

Table 1. Physicochemical characteristics of the particulate matters

Sample	Transition metal content *					Total metal	Total sulfate	Size [†] / geometric mean	pH [‡]
	Fe	Cu	Ni	V	Zn				
SRM #1648	8.91(0.4)	0.37(30)	0.11(35)	0.11(30)	3.56(73)	13.06(22)	142.66(93)	3.72/4.42	5.22
SRM #1649	6.57(4.7)	0.14(33)	0.02(100)	0.20(76)	1.49(91)	8.42(23)	93.48(91)	3.27/3.88	3.65

* Transition metal content obtained from 1 M HCl hydrolysis of PM and expressed in μg/mg PM. Values in parenthesis represent percent of the metal that is water soluble.
[†] Mass median aerodynamic diameter of PM. [‡]pH of a 10- to 11-mg/ml aqueous suspension. (From Costa and Dreher, 1997)

고 24시간 동안 다시 배양하였다. 이때 입자상 물질의 농도는 5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ 로 했는데 이것을 면적으로 환산하면 약 1.5, 15, 150 $\mu\text{g/cm}^2$ 이었다. 100% 세포독성의 지표(A100)는 배지에 0.05% 트라이톤-엑스(triton-X)가 포함되도록 하였고 0% 세포독성의 지표(A0)는 배지만 넣어서 배양한 군으로 하여 세포독성을 환산하였다. 반응이 끝난 후 PBS로 세척하고 0.006% 뉴트랄 레드(neutral red)가 포함되고 페놀 레드(phenol red)는 없는 배지로 갈아준 뒤 70분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS로 다시 세척하고 30% 에탄올에 0.01 N 염산이 포함되도록 한 용출액을 가하여 녹인 후 550 nm로 파장을 고정한 microplate로 흡광도를 측정하였으며 세포독성은 아래와 같은 식으로 환산하였다(Kim et al., 1999).

$$\text{Cytotoxicity} = (A_0 - A_s/A_0 - A_{100}) \times 100$$

2) 폐포 대식세포(RAW 264.7 cell)에 대한 독성 측정

RAW 264.7 세포를 입자상 물질로 자극하고 24시간 배양후 배양판(culture plate)에 붙어 있는 세포의 생존율을 측정하였다. 이때 입자상 물질의 농도는 500 $\mu\text{g/ml}$ 로 하였으며 이산화규소(SiO_2), 이산화티탄(TiO_2)의 세포독성과 비교하였다(Kim et al., 1997).

6. 통계학적 검정

모든 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 두 군간의 차이는 Wilcoxon rank sum test로 검정하였고, 시간에 따른 변화나 입자상 물질 농도에 따른 변화의 경향은 GLM의 trend test로 검정하였다. 분석은 SPSS 프로그램을 이용하였다.

결 과

1. 입자상 물질이 폐 상피세포(A549 cell)의 반응성 산소유리기와 반응성 질소유리기 생산에 미치는 영향

폐 상피세포를 입자상 물질(SRM #1649)로 자극하였을 때 과산화수소 분비는 Figure 1과 같다. 입자상 물질의 농

도가 증가할수록 A549 세포에서 과산화수소의 생산이 증가되었으며 입자상 물질의 농도가 500 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다.

폐 상피세포를 500 $\mu\text{g/cm}^2$ 의 입자상 물질(SRM #1649)로 자극한 후 시간 경과에 따른 아질산염 분비량의 변화는 Figure 2와 같다. 1시간 경과 후부터 아질

산염 분비가 증가하였으며 24시간 후까지 계속되었다.

자극하는 입자상 물질의 농도가 증가할수록 아질산염도 증가하는 양-반응관계를 보였다($p < 0.05$, Figure 3). SRM #1648에서는 50 $\mu\text{g/cm}^2$ 과 500 $\mu\text{g/cm}^2$ 의 농도에서, SRM #1649에서는 500 $\mu\text{g/cm}^2$ 에서 각각 대조군에 비하여 유의하게($p <$

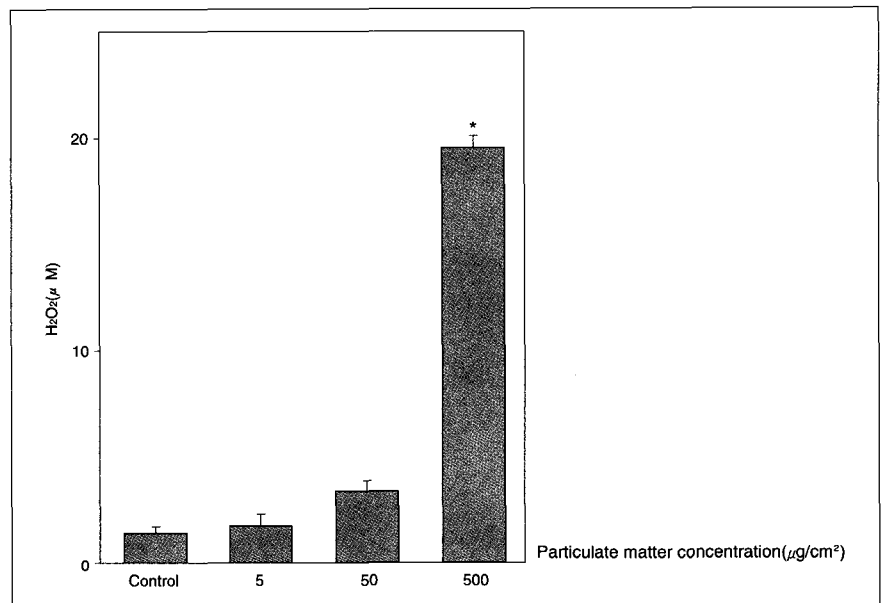


Figure 1. H₂O₂ production from lung epithelial cells stimulated with SRM #1649. H₂O₂ production in 500 $\mu\text{g/cm}^2$ of PM is significantly higher than control ($p < 0.05$) *significant difference from control at $p < 0.05$

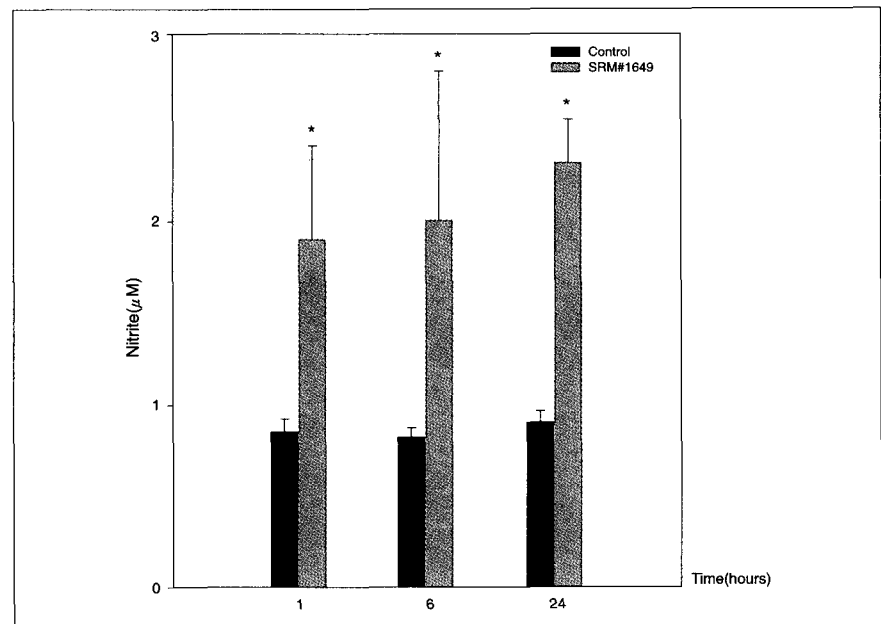


Figure 2. Nitrite production from lung epithelial cells stimulated with SRM #1649. Nitrite production is significantly higher than control after 1, 6, and 24 hours of stimulation *significant difference from control at $p < 0.05$

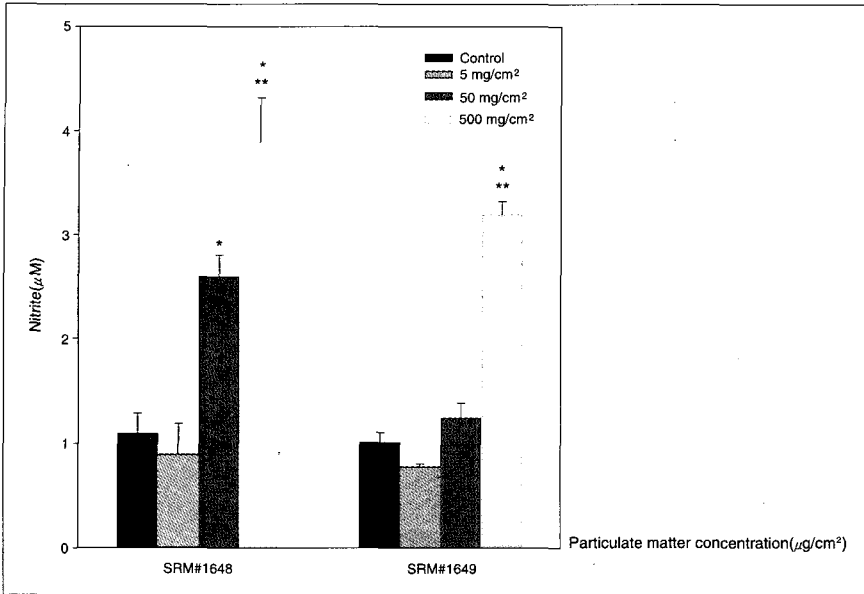


Figure 3. Nitrite production from lung epithelial cells stimulated with PM.
 Nitrite production is significantly increased at the concentration of 50, 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p < 0.05$). As the concentration increase, nitrite production also increase linearly ($p < 0.05$)
 *significant difference from control at $p < 0.05$
 **significant linear increase with concentration at $p < 0.05$

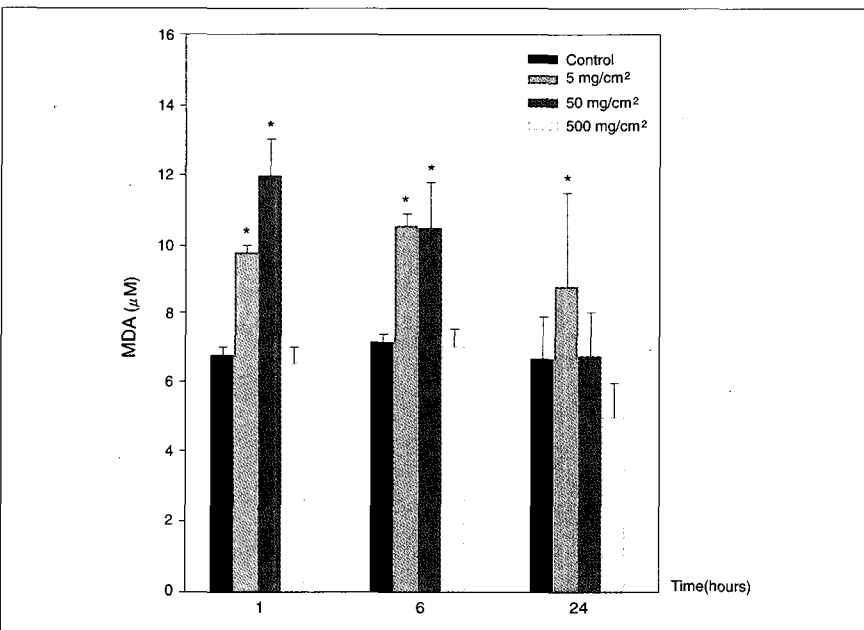


Figure 4. Lipid peroxidation of lung epithelial cells exposed to SRM #1649.
 Lipid peroxidation is significantly increased at the concentration of 5, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p < 0.05$).
 *significant difference from control at $p < 0.05$

0.05) 증가하였다.

2. 입자상 물질이 세포의 지질과산화에 미치는 영향

세포를 용해시킨 상층액 내 말론다이

알데하이드(MDA)의 양은 Figure 4에서 보는 바와 같다. 반응시간이 1시간과 6시간인 경우 입자상 물질의 농도가 5, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 일 때 대조군에 비하여 MDA 양이 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다. 24시간 반응

군에서는 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 군에서만 대조군에 비하여 유의하게($p < 0.05$) 증가되었으며 양-반응관계는 보이지 않았다.

3. 입자상 물질의 세포독성

입자상 물질(SRM #1649)이 폐 상피세포에 미치는 독성은 Figure 5와 같다. 폐 상피세포와 반응시킨 입자상 물질의 농도는 각각 5, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었는데 입자상 물질의 농도가 증가할수록 세포독성이 증가하는 양-반응 관계를 보였다($p < 0.05$).

또한 폐포 대식세포에 대한 SRM #1648, #1649와 이산화규소(SiO_2), 이산화티탄(TiO_2)의 세포독성을 비교한 결과 이산화규소의 독성이 가장 강하였고 SRM #1648, #1649, 이산화티탄의 순이었다(Figure 6).

고찰

분진이 폐장 내로 흡입되면 염증세포를 활성화시키고 활성화된 염증세포와 분진의 표면에서 생성되는 반응성 산소기가 세포를 파괴시킨다(Kamp et al., 1992; Vallyathan et al., 1992; Schapira et al., 1994). 반응성 산소기는 다량이 방출될 때는 직접 세포의 방어기전을 손상시키고 세포를 파괴하는 세포독성을 나타내나(Simeonova & Luster, 1995), 소량일 때는 세포 내 신호전달계에 작용하여 여러 가지 염증성 매개물질의 분비를 증가시켜 손상된 조직 주위에 염증반응과 섬유화 반응을 자극하고 유지시킨다(Kim et al., 1999). 분진에 의한 질환 발생에는 이러한 산소기에 의한 직접손상과 세포활성화에 의한 염증 지속효과가 모두 작용하는 것으로 생각되는데, 이 과정에는 분진에 포함되어 있는 금속들이 관여한다. 금속은 펜톤 반응(Fenton reaction)을 통하여 참여하는데 그중 철이 가장 중요하다. 철은 과산화수소(H_2O_2)와 초과산화이온(superoxide)의 환원을 촉진하여 반응성이 큰 수산화이온기(hydroxyl radical)를 생산하는 촉매역할(Fenton catalyst)을 한다(윤임중, 1998). 본 실험

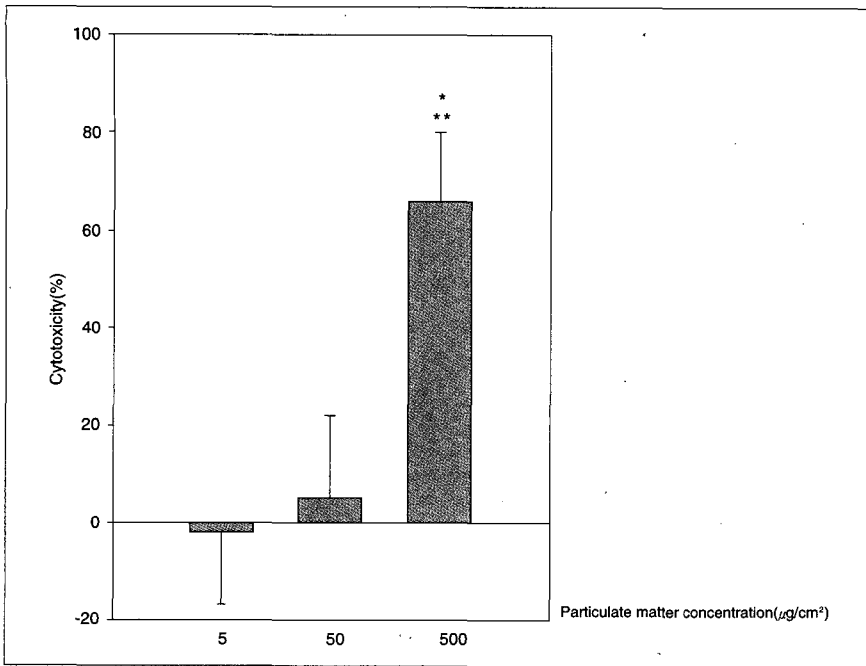


Figure 5. Cytotoxicity of SRM #1649 on lung epithelial cells.

Cytotoxicity is significantly higher than control at the concentration of 500 µg/cm² (p<0.05). As the concentration increase, cytotoxicity also increase linearly (p<0.05)

*significant difference from control at p<0.05

**significant linear increase with concentration at p<0.05

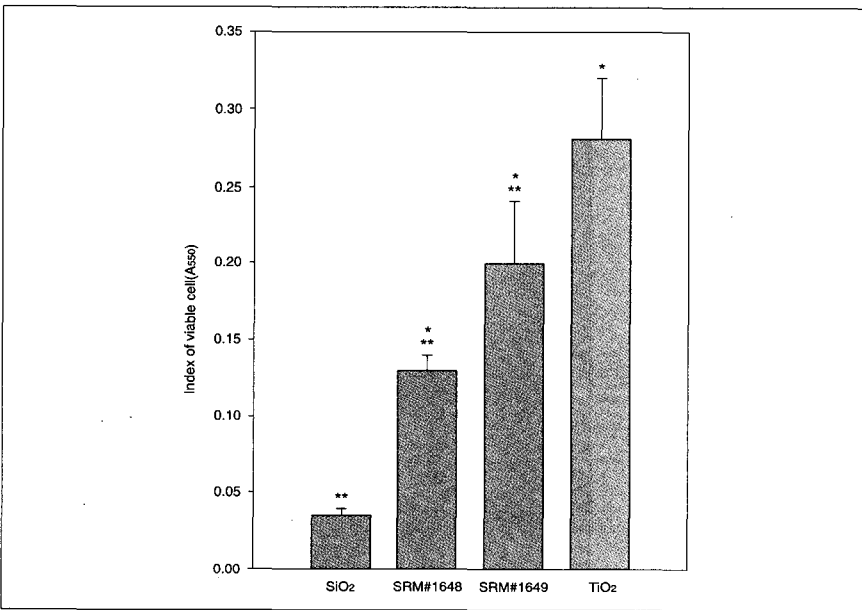


Figure 6. Cytotoxicity of particles on RAW 264.7 cells.

Cytotoxicity of particulate matters (SRM#1648, SRM#1649) is significantly different from SiO₂ and TiO₂

*p<0.05 vs SiO₂

**p<0.05 vs TiO₂

에서 사용한 입자상 물질중 상대적으로 독성이 강한 SRM #1648에서 철 함량이 많았으며, 이는 다른 분진과 마찬가지로 입자상 물질의 독성에도 금속, 특히 철이

중요하게 관여하고 있음을 암시한다. 한편 Kwon 등(1979)은 서울의 대기중 금속 함량도 철이 가장 많다고 했다. 아질산염은 반응성 질소기의 하나로

질산화물(nitric oxide) 생산과정의 최종 산물이다. 질산화물은 초과산화이온을 제거하는 역할을 한다는 증거가 있으므로 초과산화이온에 의한 세포나 조직의 손상을 감소시킨다고 볼 수도 있으나, 이와는 반대로 질산화물로부터 유도된 페록시아질산염(peroxynitrite)과 그 생성물들은 질산화물보다 반응성이 커서 조직의 손상을 가중시킬 수도 있다(윤임중, 1998). 따라서 반응성 질소기가 폐세포에 미치는 영향은 완전히 밝혀지지 않았으나, 세포의 철 함량에 변화를 일으킨다는 것이 공통된 연구결과이며 이 과정에서 철화합물이 반응성 질소기의 독성을 막는 역할을 보인다고 한다(Wink et al., 1998). 본 실험에서도 입자상 물질이 폐세포의 아질산염 생산을 증가시켰는데 SRM #1648이 상대적으로 더 강한 반응성을 나타내었다(Figure 3).

한편, 말론다이알데하이드(MDA)는 과산화물의 중요한 분해산물로 세포막 지질과산화의 정도를 정량화할 수 있는 지표이다. 본 실험에서 세포를 용해시킨 상층액 내 MDA의 양(그림 4)은 입자상 물질 반응시간이 1시간과 6시간인 경우 농도가 5, 50 µg/cm²일 때 대조군에 비하여 증가하였으나 24시간 반응군에서는 5 µg/cm² 군에서만 대조군에 비하여 유의하게 증가되어 있었다. 세포독성이나 지질과산화 산소기나 질소기에 의하여 이루어진다는 점을 생각해 볼 때 입자상 물질의 농도가 높을수록, 시간이 지날수록 MDA의 양이 증가할 것으로 예상되었으나 고농도에서는 오히려 감소하는 경향을 보였으며 이는 Schapira 등(1994)의 연구결과와 같으나 이에 대한 확실한 설명은 아직 어렵다.

최근 입자상 물질에 대한 연구가 활발히 진행되면서 입자의 크기가 작아질수록 인체에 미치는 영향이 많아진다는 보고가 계속되고 있으며, 이는 같은 양의 입자상 물질을 흡입시 크기가 작을수록 총 표면적이 넓어져 폐에 미치는 독성이 커지기 때문이다(Hatch et al., 1985; Dhio et al., 1996). 또한 분진에 함유된 철도 독성에 관여하는데, 철의 함량은 분진의 중

류에 따라 다르다. 석면이나 석탄분진은 철 함량이 높고 석영은 비교적 낮아서 철과 분진의 생물학적 활성도의 관계는 주로 석면을 이용해 연구하였으나, 다른 분진에서도 같은 영향을 미칠 것으로 생각된다(Kim et al., 1999). 실제로 철 착화제인 테스페리옥사민(desferrioxamine)은 펜톤 활성도(Fenton activity)와 반응성 산소기 생산을 감소시키므로, 분진에 의한 섬유화 반응에 방어효과를 나타낼 것으로 생각된다(Dalal et al., 1990; Kim et al., 1999). 철 이외에도 분진에 포함된 수용성 금속의 총량(Costa & Dreher, 1997)이나 아연(Gavett et al., 1997)이 이러한 염증성 반응과 관련이 있다고 한다. 본 실험에 사용된 두 가지 입자상 물질중 금속 함량이 상대적으로 많은 SRM #1648이 아질산염 생산과 세포독성에서 상대적으로 강한 반응을 보였으나 이것은 금속뿐 아니라 황산화물도 더 많이 포함하고 있으므로 유기화합물의 영향에 대한 연구가 더 필요하다.

결 론

입자상 물질은 폐장 내로 흡입되면 세포에 독성을 나타내는데, 반응세포로부터 산소기와 질소기를 생산시켜 세포를 파괴하는 한편, 염증 매개물질을 분비시켜 염증과 면역반응을 지속시킨다. 실험관내 모델을 이용하여 입자상 물질에 의한 폐상피세포와 폐포 대식세포의 변화를 알아본 결과는 다음과 같았다.

1. 입자상 물질은 폐 상피세포와 폐포 대식세포의 반응성 산소유리기와 반응성 질소유리기의 생산을 유의하게 증가시키며, 그 양은 농도가 높아질수록 시간이 지날수록 증가하였다.

2. 입자상 물질은 세포의 지질과산화물을 증가시켰으나 양-반응관계는 보이지 않았다.

3. 입자상 물질의 농도가 증가할수록 세포독성이 증가하였으며, 두 가지 중에서 금속과 황산화물의 함량이 많은 입자상 물질의 독성이 더 강하였다.

본 연구 결과 대도시의 입자상 물질이

폐의 염증반응을 일으키는 데는 반응성 산소기와 질소기, 그리고 이에 의한 세포 염증 매개물질이 관여하는 것으로 생각되며 향후 염증을 일으키는 원인물질, 특히 입자상 물질에 포함된 금속이 염증에 미치는 영향에 대해 다양한 연구가 필요하다.

감사의 말씀

본 연구의 수행을 위하여 도움을 주신 예산재단에 감사를 드립니다.

참고문헌

- 윤임중. 진폐증의 최신지견. 의학문화사; 1998, (114-141쪽).
- Costa DL, Dreher KL. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *Environ Health Perspect* 1997; 105(Suppl)5: 1053-1060
- 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
- Devlin RB. Air pollution: Human health studies. In: Rom WN, editor. Environmental and occupational medicine. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.1539-1548.
- Dreher KL, Jaskor RH, Lehmann JR, Richards JH, McGee JK, et al. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J Toxicol Environ Health* 1997; 50: 285-305
- Gavett SH, Madison SL, Dreher KL, Winsett DW, McGee JK, et al. Metal and sulfate composition of residual oil fly ash determines airway hyperreactivity and lung injury in rats. *Environ Res* 1997; 72: 162-172
- Ghio AJ, Pritchard RJ, Lehmann JR, Winsett DW, Hatch GE. Lung inflammation after exposure to nonfibrous silicates increases with chelatable [Fe³⁺]. *J Toxicol Environ Health* 1996; 49: 11-28
- Hatch GE, Boykin E, Graham JA, et al. Inhalable particles and pulmonary host defense: in vivo and in vitro effects of ambient air and combustion particles. *Environ Res* 1985; 36: 67-80
- Heinzel B, John M, Klatt R, Bohme E, Mayer

- B. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthetase. *Biochem J* 1992; 281: 627-630
- Kamp DW, Gracefla P, Pryor WA, Weitaman SA. The role of free radicals in asbestos-induced disease. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 373-376
- Kim KA, Lim Y, Kim JH, Chang HS, Park CY, Yun IG, Oh MH. The effect of hydroxyl radical generation on the cytotoxicity of alveolar macrophage and lipid peroxidation of erythrocyte membrane by mineral fibers. *Korean J Occup Med* 1997; 9(3): 401-410 (Korean)
- Kim KA, Kim EK, Kim JH, Lim Y. Effect of desferrioxamine on silica-induced cytotoxicity of A549 and fibroblast proliferation. *Korean J Occup Environ Med* 1999; 11(2): 127-136 (Korean)
- Kwon SP, Chung Y, Lim DK. Heavy metals of the suspended particulate in atmosphere of Seoul city. *Korean J Prev Med* 1979; 12(1): 49-55 (Korean)
- Lioy PJ, Zhang J. Air pollution. In: Swift DL, Foster WM, editors. Air pollutants and the respiratory tract. New York: Marcel Dekker; 1999, p.1-38.
- McClellan RO. Risk Assessment. In: Rom WN, editor. Environmental and Occupational Medicine. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.1691-1708.
- Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-896
- Peters A, Doring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: A link to mortality? *Lancet* 1997; 349: 1582-1587
- Schapiro RM, Ghio AJ, Effros RM, Morrissey J, Dawson CA, et al. Hydroxyl radicals are formed in the rat lung after asbestos instillation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 573-579
- Simeonova PP, Luster MI. Iron and reactive oxygen species in the asbestos-induced tumor necrosis factor α from alveolar macrophages. *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
- Wink DA, Feelisch M, Fukuto J, Chistodoulou D, Jour'd heuil D, et al. The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch Biochem Biophys* 1998; 351: 66-74