

## 디젤분진이 폐포대식세포에서 nitric oxide의 생성과 inducible nitric oxide synthase의 발현 및 nitrotyrosinated-protein의 형성에 미치는 효과

임 영<sup>1</sup> · 최명옥<sup>1</sup> · 이권행<sup>1</sup> · 김경아<sup>1</sup> · 김길수<sup>2</sup> · 이명현<sup>3</sup> · 리천주 · 이수진 · 최농훈\*

건국대학교 수의과대학, <sup>1</sup>카톨릭의과대학교, <sup>2</sup>경북대학교 수의과대학, <sup>3</sup>국립수의과학검역원

Received December 8, 2005 / Accepted January 6, 2005

**The Effects of Diesel Exhaust Particles on the Alveolar Macrophages for Inducible Nitric Oxide Synthase Induction and Nitric Oxide with Nitrotyrosinated-protein Formation.** Young Lim<sup>1</sup>, Myung-Ok Choe<sup>1</sup>, Kweon-Haeng Lee<sup>1</sup>, Kyung-A Kim<sup>1</sup>, Kil-Soo Kim<sup>2</sup>, Myoung-Heon Lee<sup>3</sup>, Tian Zhu Li, Soo-Jin Lee and Nong-Hoon Choe\*. *Konkuk University College of Veterinary Medicine, Seoul.* <sup>1</sup>*Catholic University College of Medicine, Seoul.* <sup>2</sup>*Kyungpook national University College of Veterinary Medicine,* <sup>3</sup>*National Veterinary Research and Quarantine Service – Epidemiological studies have demonstrated an association between exposure to diesel exhaust particles (DEP) and adverse cardiopulmonary effects. Despite the epidemiological proof, the pathogenesis of DEP-related pulmonary diseases remain poorly understood. So, comprehensive *in vivo* and *in vitro* researches are required to know the effects of DEP on diverse lung diseases. Alveolar macrophages (AM) and airway epithelial cells are known as important cellular targets in DEP-induced lung diseases. Other studies have shown that nitric oxide (NO) is involved in particle matter induced lung injury. The present study was undertaken to determine whether DEP has an synergistic effects on lipopolysaccharide (LPS)-induced NO formation and inducible nitric oxide synthase (iNOS) with nitrotyrosinated-protein formation in cultured primary alveolar macrophages. The formation of NO was determined through the Griess reaction in the cultured medium and iNOS with nitrotyrosinated-proteins are analyzed by immunohistochemical staining and Western analysis. The results indicate that DEP exposure does not induce NO formation by itself, however DEP showed significant synergistic effects on LPS-induced NO formation. So, our results suggest that DEP inhalation could aggravate inflammatory lung disease through NO formation.*

**Key words** – Diesel exhaust particles, alveolar macrophages, nitric oxide, nitrotyrosinated-protein, lipopolysaccharide.

최근의 연구에 따르면 전 세계적으로 환경오염이 증가하고 있는 추세이다[15,18,20]. 여러 환경오염 중 특히 대도시의 대기오염은 점차 악화되어 일반 시민의 건강을 위협하고, 심·폐 질환의 발병률과 이로 인한 사망률도 증가한다고 한다[2,10]. 대표적인 대기 오염물질로는 이산화질소, 오존, 미세분진 등이 있는데[12] 이러한 미세분진의 흡입은 알레르기성 비염 및 천식과 같은 알레르기성 질환과[18,20] 염증성 폐 질환을 악화시킨다고 알려져 있다[9,11,21].

대도시의 공기 중에 부유하는 디젤분진(diesel exhaust particles, DEP)은 미세분진의 일종으로 디젤 연료가 불완전하게 연소되어 발생하는 공기오염물로 산업화에 따른 교통량 및 기타 산업시설의 증가로 인하여 발생하는 양이 해마다 증가하고 있는 추세이고, 이에 따라 DEP에 대한 관심은 사람의 건강과 관련하여 점차 높아지고 있다[3,19]. DEP는 크기가 작아 기도와 폐포에 침전될 수 있으며 이로 인해 새로운 호흡기계 질환의 유발이나 기존의 염증성 호흡기계 질환

에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[7,22]. DEP는 polyaromatic hydrocarbons, nitroaromatic hydrocarbons, heterocyclics, quinones, aldehydes, aliphatic hydrocarbons과 같은 다양한 유기화합물을 포함하는 유기 탄소 핵으로 이루어져 있으며[23], 사람이 흡입 시 호흡기 내에서 돌연변이 유발 요인이나 발암물질로 작용한다는 보고가 있다[5,14]. 또한 각종 급·만성 호흡기 질환들을 악화시키고 알레르기 반응을 악화시킨다고 알려져 있다[1].

호흡을 통하여 외부로부터 이물질이 폐 내로 들어왔을 때 이물질의 제거에 중요한 역할을 담당하는 세포로 폐포대식 세포가 있다[13]. DEP에 의한 폐포대식세포의 다양한 기능 조절에 대한 작용은 잘 알려지지 않은 상태이다. 따라서 본 연구는 DEP가 새로운 호흡기계 질환의 유발이나 기존의 염증성 질환에 있어서 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 배양된 폐포대식세포에서 nitric oxide (NO) 및 그 관련 물질들을 측정하였다. 각종 흡입성 이물질에 의한 폐 질환의 유발에 있어서 NO 및 NO에 의하여 2차적으로 생성되는 것으로 알려진 peroxynitrite anion (ONOO<sup>-</sup>)이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다[6,24]. NO는 다양한 생리 및 병리학적 활성을 나타내어 조직 내의 염증반응에 일정한 역할을 하

\*Corresponding author

Tel : +82-2-450-3709, Fax : +82-2-450-3037

E-mail : nonghoonchoi@hotmail.com

는 것으로 알려져 있다[8].

본 연구에서는 다른 흡입성 이물질에 의해서는 그 생성이 유도되는 것으로 알려진 NO가 같은 입자성인 DEP에 의해서는 그 형성에 어떤 영향을 받는지를 확인하였다. 아울러 NO와 함께 폐 손상 및 염증과 관련하여 주목을 받고 있는 ONOO<sup>-</sup>의 형성에 대해서도 nitrotyrosinated-proteins의 정량을 통하여 간접적으로 확인하고자 하였다. 또한 DEP에의 노출이 폐의 세균성 염증을 악화시킨다고 보고 된 바[4,27] DEP가 기존 폐의 염증성 질환의 증상에 미치는 효과를 NO의 형성을 통하여 알아보기 위해 세균성 내독소로 알려진 lipopolysaccharide (LPS)를 함께 처리하여 그 관계를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### DEP 시료의 확보

DEP는 국립환경연구원 자동차공해연구소에서 확보하여 -20°C에서 보관하였다. 보관된 DEP는 필요한 경우, 녹인 후 30초 동안 3번씩 초음파로 분쇄하였고 (in 0.05% dimethyl sulfoxide) 최종적으로 5% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)에 희석하여 사용하였다.

### 기관지 폐포 세척술 및 폐포대식세포의 분리

실험동물로는 Sprague-Dawley계 흰쥐를 이용하였으며 고정틀에 고정된 후 70%의 에탄올로 피부를 소독하여 개복하였고, 복부 대동맥을 통하여 완전히 사혈시켰다. 이후 폐와 기관지를 노출시킨 후 경부의 기도를 약 1/2로 절개하였고, 18-gauge cannula를 넣고 결찰한 후 폐와 기관지를 흉강에서 완전히 분리하였다. Cannula를 통해 폐 안으로 37°C의 phosphate buffered saline (PBS) 7 ml을 6회 반복 주입한 후 세척을 실시하여 폐 내 세포를 채취하였다[17]. 채취된 세포는 1000 rpm에서 10분간 원심 분리를 실시하였다.

기관지 폐포 세척술로 채취된 세포를 원심분리 후, 폐 내 세포들은 Cytospin<sup>®</sup> (Shandon, Pittsburgh, PA)을 사용하여 slide glass 위에 부착하였다. 부착된 세포는 완전히 건조한 후 Diff-Quik<sup>®</sup> stain (Dade Behring Inc., Newark, DE)을 이용하여 염색을 실시하였고, 현미경하에서 염증성 세포가 없는 것으로 확인된 세포액만을 선택하여 배양 및 각종 실험에 사용하였다.

### 폐포대식세포에서 NO 형성의 측정

선택된 폐포대식세포를 12-well tissue culture plates에 각 well 당  $3 \times 10^5$ /ml로 seeding한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2시간 배양하여 세포들을 plate에 부착시킨 후 DEP에 노출시켰다. 시간별 및 농도별 세포 배양에서 채집한 배지에서 NO의 형

성은 oxidation product인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>을 Griess reaction 방법을 통해서 측정하였다[26].

### iNOS protein와 nitrotyrosinated-protein의 세포면역염색

폐포대식세포를 4-well chamber slides (Lab-Tek, Naperville, IL)에 각 well 당  $3 \times 10^5$ /ml 세포로 5% FBS가 함유된 DMEM으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2시간 배양하여 세포를 부착시킨 후, DEP (20 µg/ml), lipopolysaccharide (LPS) (10 ng/ml) 및 LPS + DEP를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 실험에 따라 일정 시간을 배양한 후 10% 포르말린으로 5분 동안 상온에서 세포들을 고정한 후 냉장 보관하였고 이 후 필요에 따라 각종 면역염색을 실시하였다. 사용된 일차 항체의 특이성을 검증하기 위하여 복수로 준비된 동일한 다른 시료에는 일차 항체를 처리하지 않고 염색반응을 함께 실시하였다.

폐포대식세포의 endogenous peroxidase 활성을 억제하기 위해서 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 15분간 보관하였다. 그 후 1% bovine serum albumin (BSA) 용액에서 30분간 blocking을 실시한 후, monoclonal anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein 항체 (10 µg/ml; Transduction Laboratories, Lexington, KY), anti-nitrotyrosine 항체 (10 µg/ml; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)를 상온에서 1시간 처리하였다. 그 후 DAKO LSBA 2 kit로 이차 항체와 streptavidin-conjugated peroxidase (DAKO, Carpinteria, CA)을 부착시켰다. 발색은 3, 3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. Slide glass를 완전히 건조한 후 Harris's hematoxylin (Sigma Chemical Co.)으로 대조염색을 실시하였다[24]. 무작위로 300개의 세포를 세어 발색된 세포의 백분율로써 각 군의 항체 발현정도를 관찰하였다.

### iNOS protein 검출을 위한 Western analysis

iNOS 항체 (Transduction Laboratories, Lexington, KY)와 β-actin 항체 (Sigma Chemical Co.)를 각기 사용하였다. Western analysis를 위하여 면역염색과 같은 조건으로 배양된 cell을 PBS로 씻어낸 후, radioimmunoprecipitation assay (RIPA) B buffer (0.5% Nonidet P-40, 20 mM Tris, pH 8.0, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM dithiothreitol, 50 µg/ml phenylmethylsulphonyl fluoride)로 처리하고 4°C에서 30분 동안 보관하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 단백질을 분리하였고 Bradford methods를 이용하여 정량하였다. 8% SDS-PAGE gel을 사용하여 전기영동을 실시하였고 blotting membrane으로 옮긴 후 5% skim milk로 blocking을 실시하였다. 일차 항체 (anti-iNOS 1:1000)를 처리한 후, horseradish peroxidase와 이차 항체가 결합된 용액으로 처리하여 ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 densi-

tometer로 양을 측정하였다.

**통계처리**

통계 프로그램인 SPSS 10.0 for windows를 사용하여 실험 설계에 대한 분산분석은 ANOVA로, 각 처치군들 간의 비교는 Dunkun test를 실시하여 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과를 평균 ±표준편차로 표시하였고, p<0.05인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

**결 과**

**폐포대식세포의 분리**

Fig. 1에서 (A)-a는 정상 흰쥐에서 채집한 폐 내에서 분리된 세포로서 99% 이상이 폐포대식세포였다. 그리고 (A)-b는 염증성 질환이 있는 흰쥐의 폐 내에서 분리된 백혈구 세포들로 폐포대식세포가 87%를 차지했다. 본 실험에서는 염증성 세포의 존재가 확인된 (A)-b의 세포는 실험의 정확성을 위하여 사용하지 않았다.

**DEP 및 LPS의 노출에 따른 폐포대식세포의 형태 변화**

DEP (20 µg/ml)만 처리한 실험군에서는 폐포대식세포가

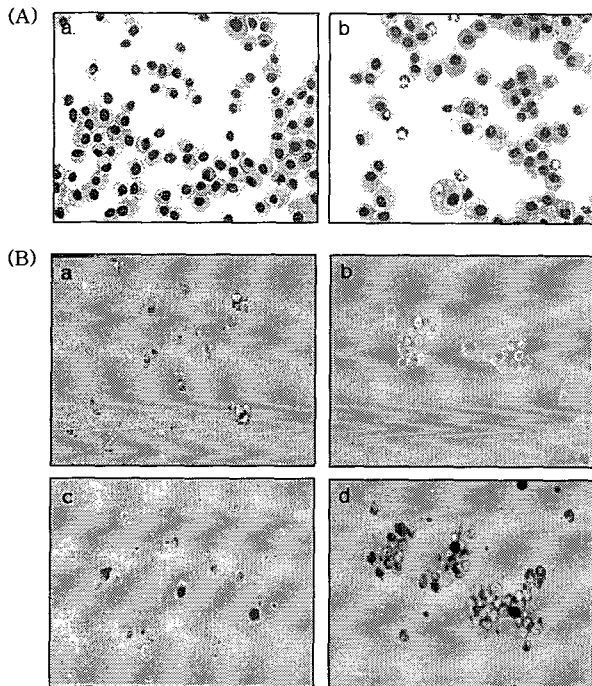


Fig. 1. Morphology of rat alveolar macrophages (AMs)(×400). (A) Diff-Quik stained AMs. a: AMs from the normal rat lung, b: Leukocyte from the inflammatory lung. (B) Cultured AMs for 24 h. a: Sham control, b: LPS (10 ng/ml) alone, c: DEP (20 µg/ml) alone, d: LPS (10 ng/ml) + DEP (20 µg/ml).

DEP를 탐식하고 있는 것을 확인 할 수 있었으나(Fig. 1, (B)-c), 세포의 형태는 대조군의 세포와 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1, (B)-a). 그러나 LPS (10 ng/ml)를 처리한 실험군에서는 세포들이 서로 결합하는 것을 관찰 할 수 있었으며 (Fig. 1, (B)-b) 이러한 현상은 LPS와 DEP를 함께 처리한 실험군에서도 관찰되었다(Fig. 1, (B)-d).

**DEP 및 LPS의 노출이 폐포대식세포에서 NO의 형성에 미치는 효과**

DEP를 처리한 경우 어느 농도에서도 NO를 형성하는 효과가 없었다. 그러나 LPS의 경우 농도가 증가함에 따라 비례적으로 NO의 형성이 증가하였다(P<0.005) (Fig. 2).

대조군에는 배지만을 처리하였고 실험군으로 DEP (20 µg/ml)과 LPS (10 ng/ml)를 개별적으로 처리한 군들을 설정하여 배양시간(6, 12, 24, 36시간)에 따른 효과들을 비교하였다. LPS만 처리한 군과 LPS 및 DEP가 함께 처리된 군들에서 배양시간에 따라 NO의 형성이 증가하는 것을 볼 수 있었다(P<0.005). 또한, LPS와 함께 DEP를 처리한 군에서 NO 형성 효과는 LPS 처리군과 비교하였을 때 시간의 경과에 따라 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

세포의 배양시간을 24시간으로 고정하고 DEP 처리 농도를 변화시켰을 때(5, 10, 20, 40, 80 µg/ml), LPS와 함께 DEP

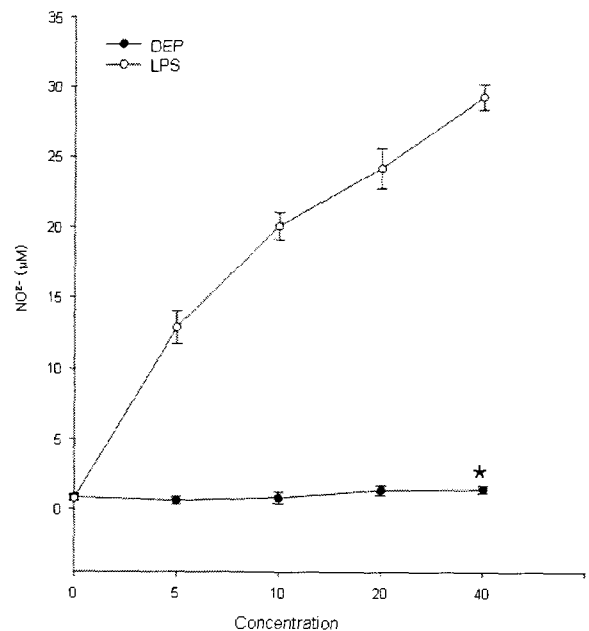


Fig. 2. Dose-response relation for DEP and LPS on NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formation in rat alveolar macrophages. Cells were cultured with various concentration of DEP (5, 10, 20, 40 µg/ml) for 24 h. \*P<0.005 versus LPS. Mean±SEM of four experiments per category.

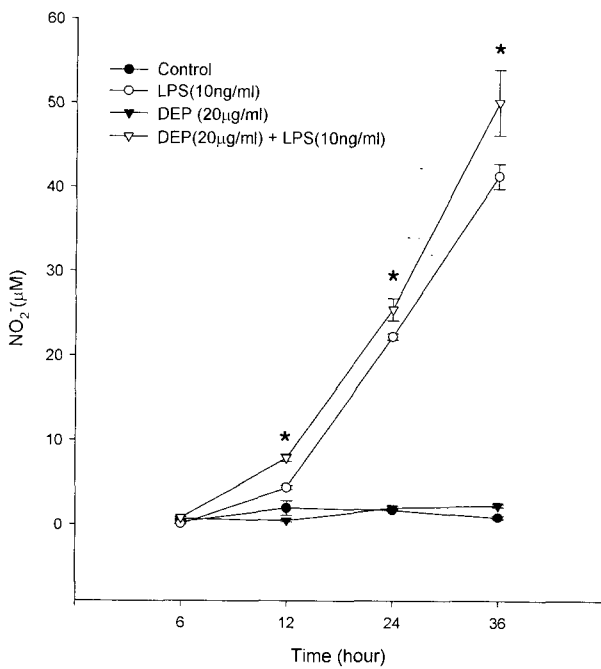


Fig. 3. Time relation for LPS, DEP and DEP with LPS on NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formation in rat alveolar macrophages. Cells were cultured with sham control, LPS (10 ng/ml), DEP (20 µg/ml) and DEP with LPS.

\*P<0.005 versus LPS. Mean±SEM of four experiments per category.

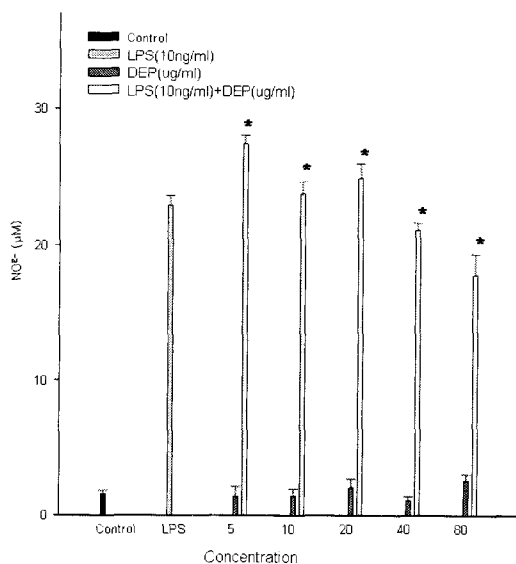


Fig. 4. Relation for various concentration of DEP with LPS on NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formation in rat alveolar macrophages. Cells were cultured with sham control, various concentration of DEP (5, 10, 20, 40, 80 µg/ml) and various concentration of DEP with LPS (10 ng/ml) for 24 h.

\*P<0.05 versus LPS. Mean±SEM of four experiments per category.

5 µg/ml의 농도를 처리한 것에서는 LPS의 단독 처리했을 때보다 NO 형성이 유의하게 증가하였으나, DEP의 처리 농도를 점차 증가시켰을 때는 오히려 NO의 형성을 억제하는 효과를 나타내었다(P<0.05) (Fig. 4).

### iNOS 형성을 확인하기 위한 세포면역염색과 Western analysis

실험결과 대조군(a)과 DEP 처리군(c)에서는 세포들에 갈색으로 발색된 iNOS가 전혀 발현되지 않았음을 확인할 수 있었다. 이에 반하여 LPS군(b)에서는 38±1.52%, LPS+DEP 처리군(d)은 45.3±0.33%으로 iNOS가 많은 세포들의 세포질에 잘 발현된 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

면역염색의 결과를 검증하기 위하여 면역염색을 위한 세포배양 조건과 동일한 조건의 시료에서 Western analysis를 실시하였을 때, densitomer로 양을 측정하여 iNOS를 β-actin으로 나눈 값으로 대조군과 DEP 처리군에서는 iNOS 단백질의 발현이 전혀 감지되지 않았다. 반면, LPS 처리군은 0.28 정도이고, LPS+DEP (20 µg/ml) 처리군은 0.33이며, LPS+DEP (40 µg/ml)를 처리군은 0.30으로 감지되었다(Fig. 6).

### Nitrotyrosinated-protein에 대한 세포면역염색

대조군(a)에서는 16.3±3.18%, DEP 처리군(c)은 13±1.20%로 갈색으로 발색된 nitrotyrosinated-protein이 확인되었다. 또한 LPS 처리군(b)에서는 49±1.15%, LPS+DEP 처리군(d)은 50.6±0.88%로 발현되어 정도의 차이는 있으나 모든 군에서 nitrotyrosinated-protein이 형성된 것을 볼 수 있었다(Fig. 7).

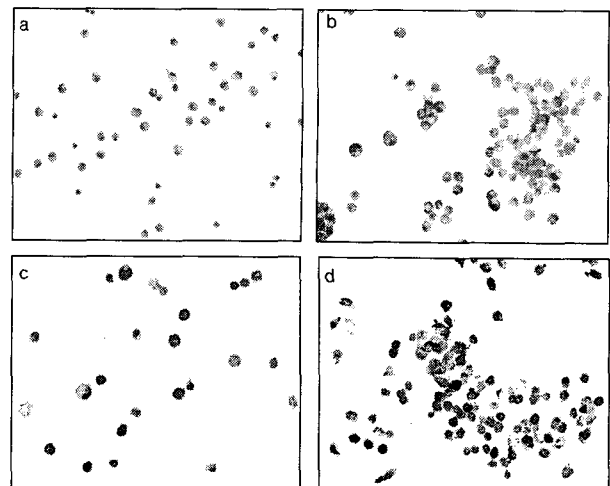


Fig. 5. Immunoperoxidase staining for iNOS protein in rat alveolar macrophages (×400). Cells were cultured with sham control, LPS, DEP and DEP with LPS for 24 h. a: sham control, b: LPS 10 ng/ml, c: DEP 20 µg/ml, d: DEP 20 µg/ml with LPS 10 ng/ml.

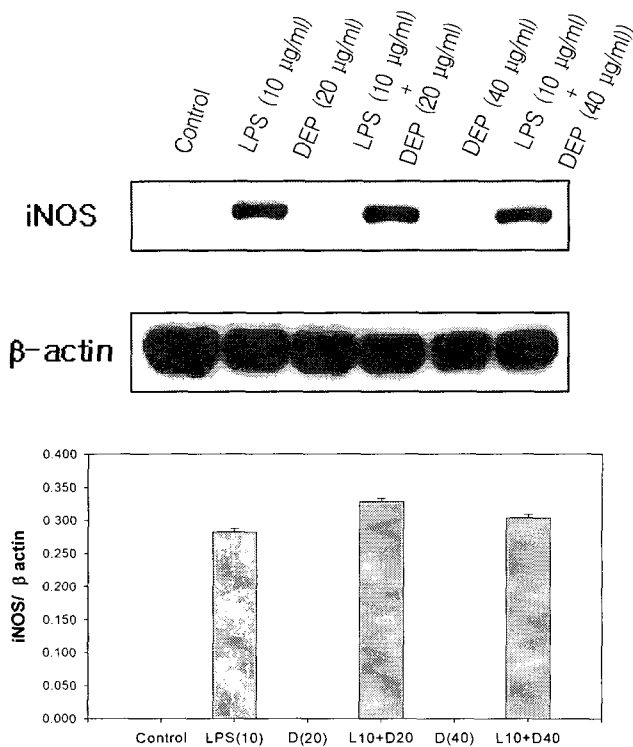


Fig. 6. iNOS protein expression in rat alveolar macrophages. Cells were cultured with sham control, LPS, DEP and DEP with LPS for 24 h.

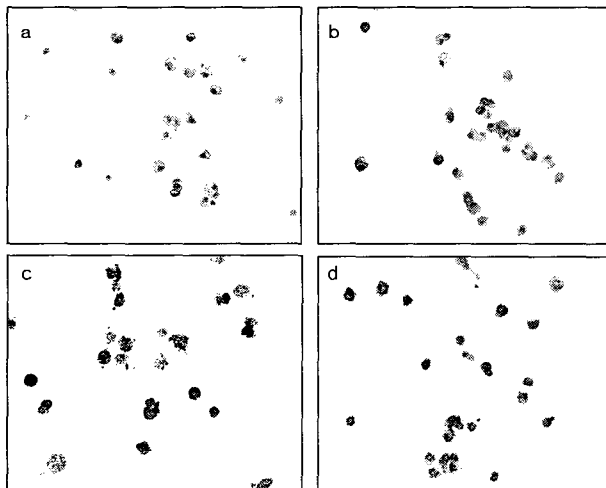


Fig. 7. Immunoperoxidase staining for nitrotyrosinated-protein (NP) in rat alveolar macrophages ( $\times 400$ ). Cells were cultured with sham control, LPS, DEP and DEP with LPS for 24 h. a: sham control, b: LPS 10 ng/ml, c: DEP 20  $\mu$ g/ml, d: DEP 20  $\mu$ g/ml with LPS 10 ng/ml.

### 고 찰

최근 대도시에서는 대기오염의 정도가 점차 악화되고 있고 이로 인한 질환들도 증가하고 있는 실정이다[2]. 대도시의

대기오염 물질 중 큰 비중을 차지하고 있는 것이 미세 분진으로[12] 특히 경유자동차의 배기가스에 포함되어 분출되는 DEP는 그 유해성이 높은 것으로 알려져 있다[3].

DEP의 흡입에 의한 질환과 관련된 연구들에는 기관지 천식 및 염증성 반응에 관련된 연구가 주로 이루어져왔다. 일반적으로 *in vivo* 실험에서는 DEP를 환경에 호흡을 통하여 노출시키거나 기관지 내로 직접 처리한 후 기관지 폐포 세척액 속에서 pro-inflammatory cytokines이나 chemokines 및 reactive oxygen synthases의 형성을 측정하는 실험들이 주로 이루어졌다[4,27]. 한편 *in vitro* 실험에서도 염증과 면역반응에 관련된 연구들이 주로 시도되었다[25]. 하지만 이전의 연구들은 거의 대부분 기관지 상피세포나 폐의 상피세포를 사용하여 연구된 것들이었다. 따라서 본 연구에서는 환경의 폐장에서 분리된 폐포대식세포만을 배양하여 DEP가 NO의 형성이나 NO의 형성에 따른 이차적 생성물의 생성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 또한, 폐에서 염증성 증상의 유발에 효과가 있는 것으로 알려진 LPS의 생물학적 효과에 DEP가 미치는 영향을 NO의 측정을 통하여 간접적으로 알아보고자 하였다.

환경에서 분리한 폐포대식세포에 DEP를 단독으로 처리해 본 결과 NO를 형성하는 효과는 어느 처리농도에서도 볼 수 없었다. 하지만 DEP와 LPS를 함께 노출시켰을 때에는 LPS에 의한 세포가 서로 결합하는 것이 관찰되었고, 이러한 형태학적인 변화는 어떤 활성변화 혹은 부착분자의 생성 등과 밀접한 관련이 있을 것이라고 추측된다. 또한 NO형성 효과를 시간의 증가에 따라서 유의성 있게 증가시켰다(처리 후 12~36시간). 이는 DEP가 폐포대식세포에서도 일정한 시간이 경과한 후에는 간접적으로 LPS의 NO 형성효과에 영향을 미칠 수 있음을 증명한 결과라고 할 수 있다. 여기에 LPS 고농도와 함께 DEP의 처리 농도를 점차로 증가한 결과 오히려 NO의 형성을 억제하는 효과를 나타내었다. 이는 농도 증가에 따른 DEP에 의한 직접적인 세포독성의 결과일 것으로 추정한다. 따라서 염증성 질환이 없는 건강한 동물이나 사람에서는 DEP의 흡입이 NO의 형성에 미치는 효과가 없거나, 극히 제한적일 것으로 추정한다. 그러나 염증성 폐 질환이 존재할 경우에는 DEP의 흡입은 NO의 형성을 통하여 부분적으로 질환의 정도를 악화시킬 것으로 추정한다. 또한 건강한 폐포대식세포에서 DEP의 탐식은 NO의 형성 이외에 다른 여러 기전을 통하여 면역이나 염증반응을 일으킬 가능성이 있을 것으로 생각한다. 기관지 폐포 세척세포들에서 DEP의 노출이 iNOS의 mRNA 발현을 증가시키는 것으로 발표된 연구결과가 있다[16]. 하지만 Ito 등[16] 이 보고한 동일한 자료에 따르면 *in vivo* 상 DEP 노출은 폐 내에 호중구를 유입시켰다. 따라서 그 결과는 DEP에 의하여 복합적인 염증성 반응이 시작된 상태에서의 결과라고 유추할 수 있다. 또한 동일한 연구자는 기관지 폐포 세척을 통하여 채취한 세포들

을 대식세포와 호중구로 분리하여 ONOO<sup>-</sup>의 형성을 별도로 간접적인 방법을 통하여 측정하였던 바 폐포대식세포에서는 호중구에 비하여 그 형성이 아주 낮은 것으로 보고하였다. 즉, 건강한 폐포대식세포는 DEP의 탐식이나 접촉을 통하여 직접적으로 NO를 형성하는 작용은 없고, 다른 간접적인 과정을 통하여 자극할 것이라고 추정한다.

DEP의 단독 처리는 iNOS의 형성을 유발하지 않았으나, LPS의 단독 및 LPS와 DEP를 함께 처리했을 때에는 iNOS의 발현을 유도하였다. 그러나 LPS를 단독처리 하였을 경우와 LPS와 DEP를 함께 처리했을 때에 유발되는 효과 사이에는 뚜렷한 양적인 차이를 확인할 수 없었다. 이는 DEP와 LPS를 함께 처리했을 때가 LPS를 단독으로 처리하였을 때 보다 NO를 형성하는 효과가 높은 수준으로 증가한 것은 아니었기 때문에 Western analysis방법으로는 미약한 차이로 발현되는 iNOS 단백질의 양을 구분할 수 없었거나, DEP의 처리가 이미 발현된 iNOS 단백질의 활성만을 증가시킨 결과였을 것으로 생각한다.

ONOO<sup>-</sup>의 형성은 대조군을 포함한 모든 처치 군에서 어느 정도는 모두 검출이 되었으나, 대조군이나 DEP 처리군과 비교하면 LPS 처리군이나 LPS와 DEP 함께 처리한 군에서 염색의 강도나 양성반응을 보인 세포의 수가 유의하게 증가하였다. 그러나 NO를 형성할 가능성이 전혀 없었던 대조군이나 DEP가 단독으로 처리된 처치군에서도 nitrotyrosin antibody에 대하여 양성반응을 보인 것은 실험에서의 처리 효과로 볼 수 없다. 이미 보고된 바에 따르면[24] tyrosine의 hydroxyl(OH)기에 ONOO<sup>-</sup>이 결합하는 반응은 비가역적 반응으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 아무 것도 처리하지 않은 대조군에서도 nitrotyrosinated-proteins이 검출된 것은 본 실험에 사용되기 이전에 이미 형성되었던 것들이 감지된 것으로 볼 수도 있다. 즉, nitrotyrosinated-proteins의 검출과 각 처치군 사이의 정량적 분석을 위해서는 본 실험에서 이용된 방법보다 좀 더 분석력이 우수한 방법이 필요하다고 판단된다.

결론적으로 배양된 흰쥐의 폐포대식세포에 DEP 단독 처리는 NO의 형성 및 iNOS와 nitrotyrosinated-proteins의 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 DEP를 LPS와 함께 처리했을 때에는 LPS에 의한 NO의 형성을 유의성 있게 상승시켰다. 따라서 폐포대식세포에서 DEP의 노출은 직접적으로 NO의 형성을 유발하지 않고, DEP의 탐식 후 일정한 시간이 경과한 다음 어떤 이차적 경로를 통하여 활성에 영향을 미치는 것으로 추정한다. 또한, 폐에 기존의 세균성 질환이 있는 동물이나 사람이 DEP를 흡입하였을 경우에는 NO의 형성을 통하여 질환을 악화시킬 수 있을 것으로 판단한다.

## 요 약

본 연구에서는 DEP의 노출이 새로운 호흡기계 질환 유발

의 가능성과 호흡기계의 염증성인자로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)의 역할에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하고자 폐에서 염증성 반응 시 생성이 증가하는 것으로 알려진 Nitric Oxide (NO)의 형성과 NO의 생성에 관련된 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 NO에 의하여 형성되는 것으로 알려진 nitrotyrosinated-protein을 폐포대식세포를 통해 분석하였다.

폐포대식세포에 DEP를 농도 별로 단독 처리하였을 때와 동일한 농도에서 배양시간을 달리하였을 때는 NO가 생성되지 않았으나 DEP와 함께 LPS를 처리하였을 때는 LPS를 단독으로 처리했을 때보다 유의성이 있게 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 NO의 생성에 관련된 효소인 iNOS 및 NO에 의하여 형성되는 것으로 알려진 nitrotyrosinated-protein 발현의 정도를 면역화학염색과 Western analysis로 확인할 수 있었다.

DEP는 폐포대식세포에서 직접적으로 NO생성에 영향을 미치지 않았으며, NO를 생성하는 iNOS나 nitrotyrosinated-protein의 발현에도 영향을 주지 않았으나 세균성 염증인자의 한 종류인 LPS가 NO를 형성하는 데에는 통계학적인 상승효과가 있었다. 결론적으로 본 연구에서는 염증성질환의 환자에서 DEP의 흡입은 간접적으로 NO를 형성하는데 영향을 미쳐 질환을 악화시킬 것으로 판단한다.

## 감사의 글

이 논문은 한국과학재단 주관 특정기초연구지원(R01-2002-00571-0)으로 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

1. Al-Humadi N. H., P. D. Siegel, D. M. Lewis, M. W. Barger, J. Y. Ma, D. N. Weissman and J. K. Ma. 2002. Alteration of intracellular cysteine and glutathione levels in alveolar macrophages and lymphocytes by diesel exhaust particle exposure. *Environ. Health Perspect* **110**, 349-353.
2. Bascom R., P. A. Bromberg and D. L. Costa. 1996. Health effects of outdoor air pollution. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 477-498.
3. Bunn W. B. III, P. A. Valberg, T. J. Slavin and C. A. Lapin. 2002. What is new in diesel. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **75(Suppl.)**, S122-S132.
4. Castranova V., J. Y. Ma, H. M. Yang, J. M. Antonini, L. Butterworth, M. W. Barger, J. Roberts and J. K. Ma. 2001. Effect of Exposure to Diesel Exhaust Particles on Susceptibility of the lung to infection. *Environ. Health Perspect* **110(suppl.)**, 609-612.
5. Cheng, Y. S., H. C. Yeh, J. L. Mauderley and B. V. Mokler. 1984. Characterization of diesel exhaust in a chronic inhalation study. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **45**, 547-555.

6. Choe, N. H., S. Tanaka and E. Kagan. 1998. Asbestos fiber and interleukin-1 upregulate the formation of reactive nitrogen species in rat pleural mesothelial cells. *Am. Respir. Cell. Mol. Biol.* **19**, 226-236.
7. Churg, A. and M. Brauer. 1997. Human lung parenchyma retains PM 2.5. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 2109-2111.
8. Coleman, J. W. 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1397-1406.
9. Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society. 1996. Health effects of outdoor air pollution. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 3-50.
10. Dockery, D. W. and C. A. III. Pope. 1994. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu. Rev. Public Health* **15**, 107-132.
11. Emanuel, M. B. 1998. Hay fever, a post industrial revolution epidemic: a history of its growth during the 19th century. *Clin. Allergy* **18**, 295-304.
12. Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards. 1996. Review of the National Ambient Air Quality Standards for Particulate Matter: policy assessment of scientific and technical information. OAQPS staff paper no. EPA-452/R-96-013.
13. Fels, A. O. and Z. A. Cohn. 1986. The alveolar macrophages. *J. Appl. Physiol.* **60**, 355-369.
14. Handa, T., T. Yamauchi, M. Ohnishi, Y. Hisamatu and T. Ishii. 1983. Detection and average content levels of carcinogenic and mutagenic compounds from the particulate on diesel and gasoline engine mufflers. *Environ. Int.* **9**, 335-341.
15. Harre, E. S. M., P. D. Price and R. B. Ayrey. 1997. Respiratory effects of air pollution in chronic obstructive pulmonary disease: a three-month prospective study. *Thorax* **52**, 1040-44.
16. Ito, T., M. Ikeda, H. Yamsaki, M. Sagai and T. Tomita. 2000. Peroxynitrite formation by diesel exhaust particles in alveolar cells: Links to pulmonary inflammation. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* **9**, 1-8.
17. Kagan, E., Y. Oghiso and D. P. Hartmann. 1983. The effects of chrysotile and crocidolite asbestos on the lower respiratory tract: analysis of bronchoalveolar lavage constituents. *Environ. Res.* **32**, 382-397.
18. Lebowitz, M. D. 1996. Epidemiological studies of the respiratory effects of air pollution. *Eur. Respir. J.* **9**, 1029-1054.
19. Peterson, B. and A. Saxon. 1996. Global increases in allergic respiratory disease: the possible role of diesel exhaust particles. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **77**, 263-270.
20. Pope, C. A. III, D. W. Dockery, J. D. Spengler and M. E. Raizenne. 1991. Respiratory health and PM10 pollution. A daily time series analysis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, 68-674.
21. Pope, C. A. III and R. E. Kanner. 1993. Acute effects of PM10 pollution on pulmonary function of smokers with mild to moderate COPD. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 1336-1340.
22. Pope, C. A. III, M. J. Thun, M. M. Namboodiri, D. W. Dockery, J. S. Evans, F. E. Speizer and C. W. Jr. Heath. 1995. Particulate air pollution as predictor of mortality in a prospective study of U. S. adults. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **151**, 669-674.
23. Schuetzle, D. and J. A. Frazier. 1986. Factors influencing the emission of vapor and particulate phase components from diesel engines. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* **13**, 41-63.
24. Tanaka, S., N. Choe, D. R. Hemenway, S. Zhu, S. Matalon and E. Kagan. 1998. Asbestos inhalation induces reactive nitrogen species and nitrotyrosine formation in the lungs and pleura of the rat. *J. Clin. Invest.* **102**, 445-54.
25. Takizawa, H., T. Ohtoshi, S. Kawasaki, S. Abe, I. Sugawara, K. Nakahara, K. Matsushima and S. Kudoh. 2000. Diesel exhaust particles activate human bronchial epithelial cells to express inflammatory mediators in the airways: A review. *Respirology* **5(2)**, 197-203.
26. Thomas, G. and P. W. Ramwell. 1988. Vasodilatory properties of mono-L-arginine-containing compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 332-338.
27. Yin, X. J., R. Schafer, J. Y. Ma, J. M. Antonini, D. D. Weissman, P. D. Siegel, M. W. Barger, J. R. Roberts and J. K. Ma. 2002. Alteration of pulmonary immunity to *Listeria monocytogenes* by diesel exhaust particles (DEPs). I. Effects of DEPs on early pulmonary responses. *Environ. Health Perspect* **11**, 1105-1111.