

Alteration of Inflammatory Cytokines by Volatile Organic Compounds in T Lymphocytes

Ji-Sook Lee¹ and In Sik Kim^{2†}

¹Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 570-750, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, School of Medicine, Eulji University and Eulji University Medical Sciences Research Center, Daejeon 301-746, Korea

In the present study, we investigated whether volatile organic compounds induce inflammatory response in human T lymphocytes by evaluating the alteration of inflammatory cytokines. Volatile organic compounds such as formaldehyde, o-xylene, benzene, and hydroquinone have no cytotoxic effects on Jurkat T cells at a high concentration of 50 μ M for 48 h. IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ were increased after the treatment with volatile organic compounds, although alteration of cytokines is different among volatile organic compounds. LPS as a positive control increased the secretion of IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ . MCP-1 and CCL17 (thymus and activation-regulated chemokine, TARC) were weakly increased after the treatment with volatile organic compounds but the amount of the increased cytokine was below 20 pg/ml. These results suggest that the measurement of cytokine in Jurkat T cells may be used as a useful method for evaluating the toxicity of volatile organic compounds in immune response.

Key Words: Volatile organic compounds, Inflammatory cytokine, T cells

서 론

휘발성 유기화합물 (volatile organic compound)은 건축자재, 실내 장식재료와 같은 다양한 재료에서부터 나오는 대기오염물질을 의미한다. 포름알데히드, 하이드로퀴논, 자일렌, 벤젠, 스틸렌 등이 휘발성 유기화합물에 속하며, 이 화합물들은 실내 오염을 일으켜서, 새집증후군을 일으킨다 (Otto et al., 1992; Bernstein et al., 2008). 새집증후군은 구토, 피부발진, 폐염증과 같은 알리지 염증성 증상을 특징으로 한다 (Thorn, 1998) 최근에는 포름알데히드가 마우스에서 폐염증질환을 일으키며, 특히 산화적 스트레스를 증가시킨다는 보고가 있었다 (Mastuoka et al., 2010). 벤젠은 골수에 작용하여 골수성 백혈병 및 골수이형성증을 일으키며, 면역반응의 이상을 초래한다 (Golding and

Watson, 1999; Synder, 2002). 벤젠의 대사산물의 하나인 하이드로퀴논은 세포 내 DNA 손상 및 면역세포의 세포고사를 유도하며 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)을 형성하여 염증반응을 일으킨다 (Schrenk et al., 1996). 이외에도 T 세포에서의 휘발성 유기화합물에 대한 효과 연구는 이루어지고 있으나, 하나의 화합물에 대한 단발성 효과 연구에 그치고 있으며, 이를 총체적으로 검색할 수 있는 생체 외 스크리닝 시스템에 대한 연구는 부족한 실정이다 (Li et al., 1997).

본 연구는 T 림프구의 세포주인 Jurkat T 세포를 이용하여 포름알데히드 (formaldehyde), o-자일렌 (o-xylene), 벤젠 (benzene), 하이드로퀴논 (hydroquinone)이 염증성 사이토카인 (IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, CCL17)에 미치는 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

세포 배양

사람의 T세포인 Jurkat T 세포 (American Type Culture Collection, Manassas, VA)는 10% 소태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 100 U/ml의 페니실린, 100 μ g/ml의 스트렙토마

*접수일: 2011년 3월 15일 / 수정일: 2011년 3월 18일
채택일: 2011년 3월 19일

†Corresponding author: In Sik Kim, Department of Biomedical Laboratory Science School of Medicine, Eulji University 143-5, Yeuongdu-dong, Jung-gu Daejeon 301-746, Korea.
Tel: +82-42-259-1753, Fax: +82-42-259-1759
e-mail: orientree@eulji.ac.kr

이신 (Life technologies, Inc., Gaithersburg, MD)이 포함된 RPMI 1640 배지 (Life technologies, Inc.)에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

휘발성 유기화합물의 세포 독성

Jurkat T 세포에서 포름알데히드, o-자일렌, 벤젠, 하이드로퀴논이 세포 독성 및 증식에 영향을 주는지 확인하기 위해 MTT 측정법 (Roche, Penzberg, Germany)을 이용하였다. 세포는 5 × 10⁴ cells/100 μl로 배양액에 부유하여 96 well plate에 분주하였다. 휘발성 유기화합물을 10 μM, 20 μM, 50 μM의 농도로 48시간 동안 각 well에 처리하였다. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 10 μl 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간을 배양한 다음 100 μl의 MTT 용해액을 추가로 첨가하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 하루 동안 둔 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소면역측정법

휘발성 유기화합물을 Jurkat T 세포에 처리한 후에 세포 상층액에 있는 IL-2, IL-4, IL-13, TNF-α, IFN-γ, CCL17의 농도는 회사의 매뉴얼에 따라서 OptEIA Set (BD Biosciences, San Diego, CA)를 이용하여 측정하였다.

MCP-1은 DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 통계적인 유의성을 측정하기 위해 Student's *t*-test로 분석하였고, 각 통계처리의 *P* 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있다고 해석하였다.

결 과

휘발성 유기화합물의 Jurkat T 세포에 대한 세포 독성 효과

Jurkat T 세포에 포름알데히드, o-자일렌, 벤젠, 하이드로퀴논을 농도별로 48시간 동안 처리하여 MTT 측정법을 통해 세포 생존율을 확인하였다. 50 μM로 처리한 휘발성 유기화합물 모두 세포 생존율을 변화시키지 않았다 (Fig. 1).

휘발성 유기화합물의 사이토카인 분비에 대한 증가 효과

Jurkat T 세포에서 분비되는 염증성 사이토카인에 대한

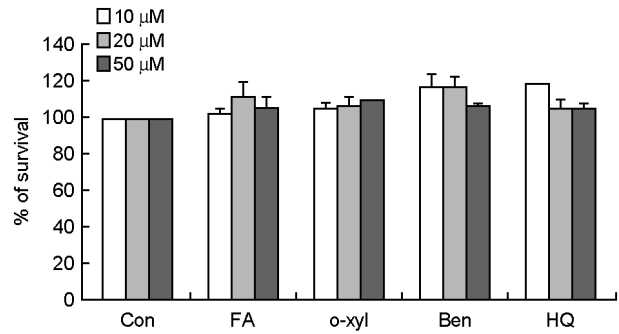


Fig. 1. The cytotoxic effects of volatile organic compounds on Jurkat T cells. Jurkat T cells were incubated with formaldehyde, o-xylene, benzene, and hydroquinone at concentrations of 10 μM, 20 μM and 50 μM for 48 h. The survival rates were then measured by a MTT assay. The data are expressed as the relative ratio to the absorbance of the untreated cells, which was set at 100%.

포름알데히드, o-자일렌, 벤젠, 하이드로퀴논의 효과분석을 통하여 휘발성 유기화합물의 염증유발효과를 조사하였다. 포름알데히드는 IL-2, IL-4, IL-13, TNF-α, IFN-γ의 분비를 시간별로 모두 유의하게 증가시켰다 (*P*<0.05). (Fig. 2A). 사이토카인에 따라서 약간의 차이는 있었지만, 포름알데히드를 처리한 후 12시간과 24시간에서 가장 높은 농도로 사이토카인 분비를 증가시켰다. 농도별 실험에서 포름알데히드 20 μM과 50 μM이 사이토카인 분비를 가장 높게 분비시키는 농도로 나타났다 (Fig. 2B). 양성 대조군으로 LPS를 처리한 세포에서도 사이토카인 분비가 증가되었으며, 포름알데히드와 비슷하거나 낮은 수준의 분비를 보여주었다 (Fig. 2B). o-xyl은 측정된 사이토카인의 양을 시간에 따라서 모두 유의하게 증가시켰다 (*P*<0.05). 특히 12시간 처리한 후에 IL-2, TNF-α, IFN-γ의 농도가 크게 증가하였으며, IL-4, IL-13은 24시간에서 크게 증가하였다 (Fig. 3A). Fig. 3B에서 보여주듯이 o-xyl은 농도별로 사이토카인의 양을 증가시켰으며, 20 μM과 50 μM에서는 LPS의 사이토카인 증가 양보다 더 많은 사이토카인을 증가시켰다. 벤젠과 벤젠의 체내 대사산물인 하이드로퀴논도 사이토카인의 양적인 차이가 있기는 하였지만, 포름알데히드와 o-xyl처럼 IL-2, IL-4, IL-13, TNF-α, IFN-γ의 분비를 시간별, 농도별로 모두 증가시켰다 (Fig. 4와 5). Fig. 6에서는 포름알데히드, o-자일렌, 벤젠, 하이드로퀴논에 의한 MCP-1과 CCL17의 분비 변화를 측정한 결과이다. IL-2, IL-4, IL-13, TNF-α, IFN-γ의 분비 변화처럼 증가하기는 하였지만, 매우 작은 양이 증가함을 나타냈다.

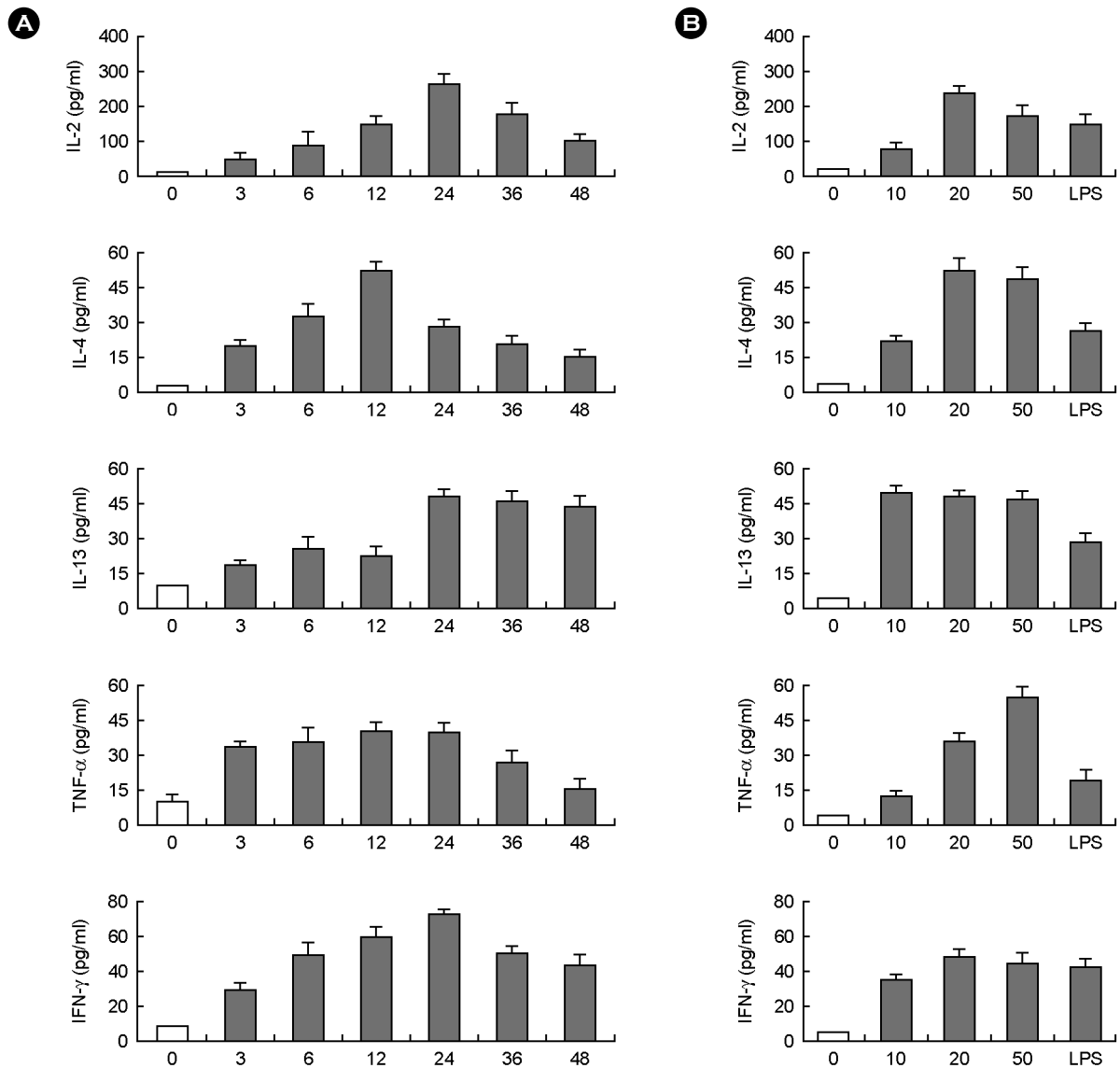


Fig. 2. Formaldehyde increases the expression of IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in Jurkat T cells. Jurkat T cells were incubated with formaldehyde at a concentration of 20 μ M for the indicated time (A). Jurkat T cells were incubated with formaldehyde at the indicated concentration for the peak time (B). The supernatant was collected and the expression of IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ was analyzed by ELISA as described in the Methods section.

고 찰

우리는 이전 연구에서 벤젠, 하이드로퀴논과 같은 휘발성 유기화합물의 면역반응에 대한 효과를 증성구와 호산구에서 알아보았다 (Moon et al., 2010; Yang and Kim, 2010). 이 연구를 통하여 휘발성 유기화합물이 세포고사, 유주운동, 세포분화에 영향을 미치는 것을 규명하였다. 본 연구는 휘발성 유기화합물의 백혈구에 대한 효과 연구의 연장선상에서 T 세포에 대한 염증반응에 대한 효과

에 초점을 맞추어 조사하였다. 염증반응에 대한 효과를 알아보기 위해서 염증반응에 중요한 사이토카인 IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α , IFN- γ 의 분비가 관찰되었으며, 이와 더불어 유주운동 및 세포활성에 영향을 미치는 케모카인 MCP-1과 CCL17의 분비변화도 측정하였다.

T 세포는 세포 독성 T 세포, 도움 T 세포, 면역억제 T 세포가 있다. 이 세포들은 각각 감염된 세포를 파괴시키는 기능, 항체를 생산할 수 있도록 B 세포를 자극시키는 기능, 과도한 면역반응을 억제하는 역할을 한다. 면역기능을 수행하기 위해서 T 세포는 다양한 사이토카인

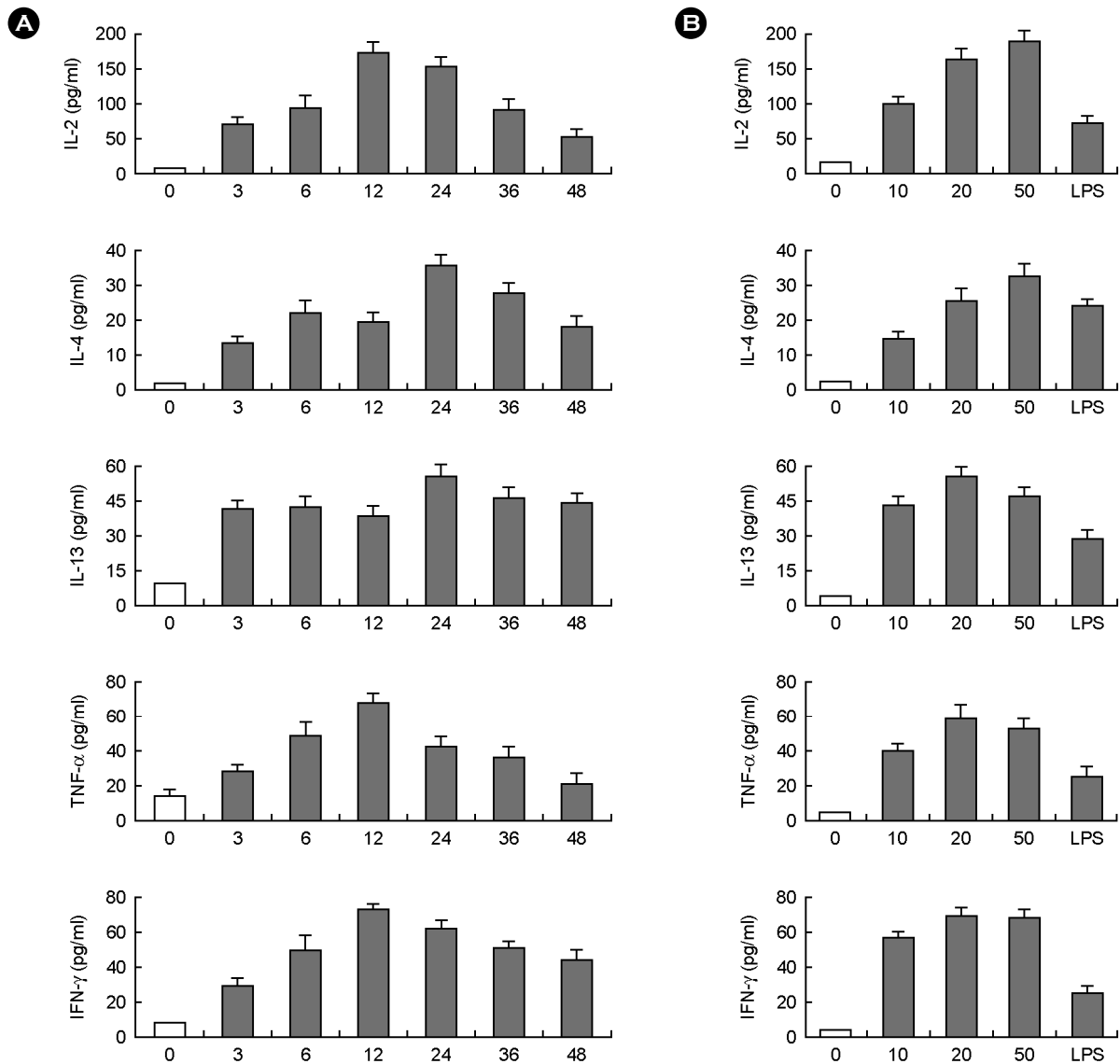


Fig. 3. o-xylene increases the expression of IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in Jurkat T cells. Jurkat T cells were incubated with o-xylene at a concentration of 20 μ M for the indicated time (A). Jurkat T cells were incubated with o-xylene at the indicated concentration for the peak time (B). The supernatant was collected and the expression of IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ was analyzed by ELISA as described in the Methods section.

및 케모카인을 분비한다 (Lucey et al., 1996; Curtsinger and Mescher, 2010). IL-2는 T 세포의 증식에 중요하며, IL-4는 호산구의 분화와 증식에 관련한다. IL-13은 B 세포의 증식과 분화에 영향을 준다. T 세포에서 분비되는 다른 사이토카인으로는 초기 염증반응에 중요한 TNF- α , 도움 T 세포의 type 1 및 대식세포를 활성화시키는 IFN- γ 가 있다. 휘발성 유기화합물을 염증유발에 대한 효과를 위해서 설명한 염증성 사이토카인을 중심으로 조사하였다. 본 연구에서 조사되어진 휘발성 유기화합물인 포름알데히드, o-자일렌, 벤젠, 하이드로퀴논은 분비를 증가시키

는 유기화합물의 농도와 시간에서 약간의 차이가 있었지만, 모두 유의하게 증가시켰다 (Fig. 2-5). 휘발성 유기화합물과 T 세포의 연관성에 대하여 최근에 연구한 내용은 하이드로퀴논과 Jurkat T 세포의 세포고사와 관련된 것이다 (Kim et al., 2009). 김 등은 하이드로퀴논이 ERK 신호전달과정과 caspase 경로를 통하여 세포고사를 일으키는 것으로 보고하였다. 또한 하이드로퀴논은 림프구 증식의 손상 및 사이토카인의 억제에 대한 보고가 있었다 (Li et al., 1996; McCue et al., 2000). 하지만, 본 연구에서는 하이드로퀴논은 증식 및 생존에 전혀 영향을 미치지

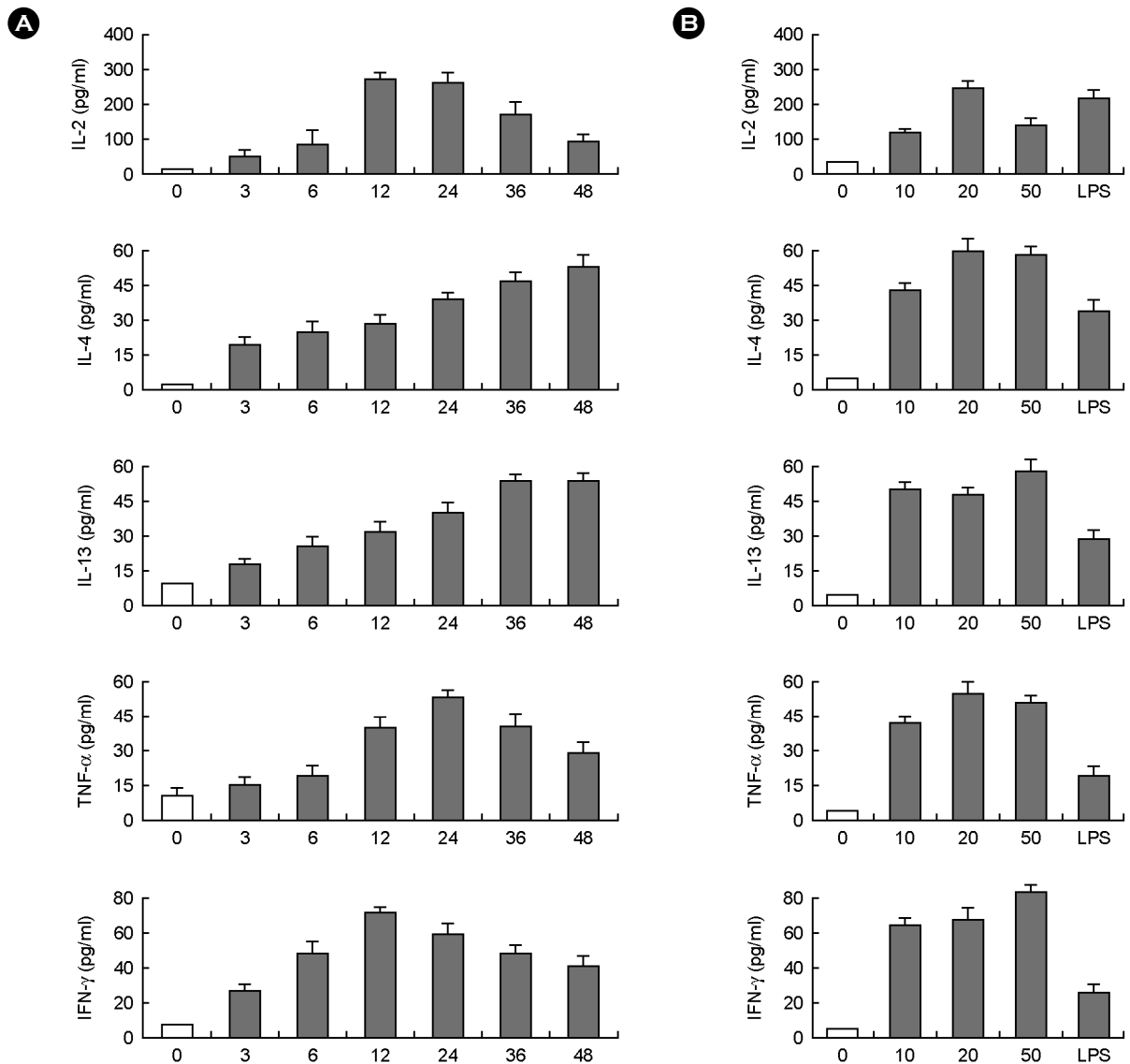


Fig. 4. Benzene increases the expression of IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in Jurkat T cells. Jurkat T cells were incubated with benzene at a concentration of 20 μ M for the indicated time (A). Jurkat T cells were incubated with benzene at the indicated concentration for the peak time (B). The supernatant was collected and the expression of IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ was analyzed by ELISA as described in the Methods section.

않았고 (Fig. 1), 오히려 염증성 사이토카인을 증가시켰다 (Fig. 2-6). 다른 휘발성 유기화합물인 아세트알데히드 (acetaldehyde), 페놀 (phenol), 벤젠, 부티알데히드 (butyraldehyde), 이소프렌 (isoprene), 스티렌 (styrene), 톨루엔 (toluene)은 마우스 림프구의 증식에 영향을 주지 않는다는 보고가 있었다 (Poirier et al., 2002). 하지만, 포름알데히드, 카테콜 (catechol), 아크릴니트릴 (acrylonitrile), 프로피온알데히드 (propionaldehyde), 하이드로퀴논은 T 림프구와 B 림프구의 증식을 억제하였다. 하이드로퀴논은 T 림프구를 억제하는 것으로 나타났고, 포름알데히드도 세

포증식을 억제하는 것으로 나타났다. 사람 T 세포가 아닌 마우스 림프구를 사용한 점이 다르기는 하지만, 김 등의 논문에서 보여주었던 하이드로퀴논의 결과와 유사하게 나타났다. 본 연구 결과와 다른 연구그룹의 연구 결과와의 다른 점은 이번 연구가 보여주었던 사이토카인 분석 이외에 관련된 신호전달과정을 규명함으로써 좀 더 명확히 원인을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다. 또한 휘발성 유기화합물들의 사이토카인 분비에 관련된 신호전달 과정에서 공통된 신호전달단백질을 규명한다면, 휘발성 유기화합물에 유발되는 새집증후군과 같은 염증질환을

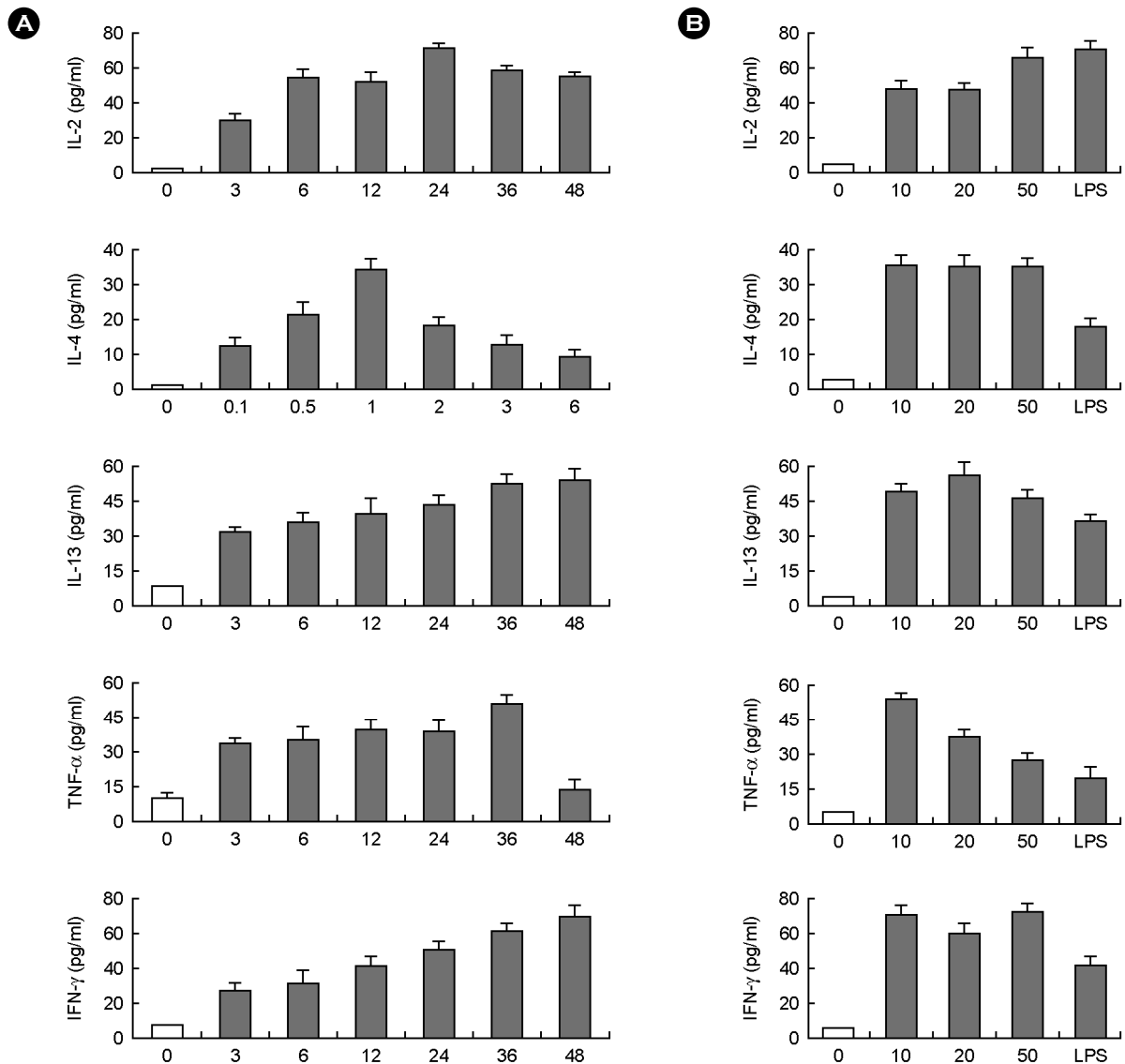


Fig. 5. Hydroquinone increases the expression of IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in Jurkat T cells. Jurkat T cells were incubated with hydroquinone at a concentration of 20 μ M for the indicated time (A). Jurkat T cells were incubated with hydroquinone at the indicated concentration for the peak time (B). The supernatant was collected and the expression of IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ was analyzed by ELISA as described in the Methods section.

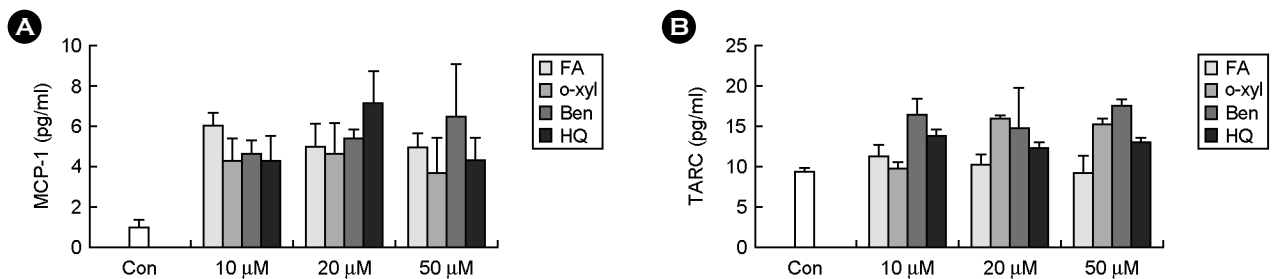


Fig. 6. Volatile organic compounds increase the expression of MCP-1 and CCL17 in Jurkat T cells. Jurkat T cells were incubated with formaldehyde, o-xylene, benzene, and hydroquinone at the indicated concentration for 48 h. The supernatant was collected and the expression of MCP-1 (A) and CCL17 (B) was analyzed by ELISA as described in the Methods section.

치료하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. Fig. 6에서 보여주는 것처럼 휘발성 유기화합물은 단핵구 유주운동에 관여하는 MCP-1과 T 세포의 유주 및 염증반응을 일으키는 CCL17도 증가시켰다. 하지만, 증가 양이 상당히 낮기 때문에, 실질적인 면역반응에 대한 효과는 좀 더 연구가 진행되어야 한다.

본 연구의 결과에서 휘발성 유기화합물이 T 세포의 증식과 생존에는 영향을 주지 않으며, 염증성 사이토카인 (IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α , IFN- γ)의 분비를 크게 증가시킨다. 이 연구 결과는 다른 휘발성 유기화합물의 염증유발 효과를 스크리닝하는 방법으로 활용이 가능하며, 나아가 신호전달과정 규명을 통하여 관련질환의 치료제 개발에도 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Bernstein JA, Alexis N, Bacchus H, Bernstein IL, Fritz P, Horner E, Li N, Mason S, Nel A, Oullette J, Reijula K, Reponen T, Seltzer J, Smith A, Tarlo SM. The health effects of non-industrial indoor air pollution. *J Allergy Clin Immunol.* 2008. 121: 585-591.
- Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2010. 22: 333-340.
- Golding BT, Watson WP. Possible mechanisms of carcinogenesis after exposure to benzene. *IARC Scientific Pub.* 1999. 150: 75-88.
- Kim YJ, Woo HD, Kim BM, Lee YJ, Kang SJ, Cho YH, Chung HW. Risk assessment of hydroquinone, differential responses of cell growth and lethality correlated to hydroquinone concentration. *J Toxicol Environ Health A.* 2009. 72: 1272-1278.
- Li Q, Aubrey MT, Christian T, Freed BM. Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol. *Fundam Appl Toxicol.* 1997. 38: 148-165.
- Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1996. 9: 532-562.
- Matsuoka T, Takaki A, Ohtaki H, Shioda S. Early changes to oxidative stress levels following exposure to formaldehyde in ICR mice. *J Toxicol Sci.* 2010. 35: 721-730.
- McCue JM, Link KL, Eaton SS, Freed BM. Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation. *J Immunol.* 2000. 165: 6771-6775.
- Moon SH, Yang EJ, Song BB, Kim B-M, Lee J-S, Kim IS. Effects of benzene, phenol and hydroquinone on proliferation, differentiation and migration of human eosinophilic EoL-1 cells. *J Exp Biomed Sci.* 2010. 16: 179-185.
- Otto D, Hudnell H, House D, Mølhave L, Counts W. Exposure of humans to a volatile organic mixture in behavioral assessment. *Arch Environ Health.* 1992. 47: 23-30.
- Poirier M, Fournier M, Brousseau P, Morin A. Effects of volatile aromatics, aldehydes and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. *J Toxicol Environ Health A.* 2002. 65: 1437-1451.
- Schrenk D, Orzechowski A, Snyder R, Burchell B, Ingelman-Sundberg M, Bock KW. Phase II metabolism of benzene. *Environ Health Perspect.* 1996. 104: 1183-1188.
- Snyder R. Benzene and leukemia. *Crit Rev Toxicol.* 2002. 32: 155-210.
- Thorn A. The sick building syndrome, a diagnostic dilemma. *Soc Sci Med.* 1998. 47: 1307-1312.
- Yang EJ, Kim IS. The effects of volatile organic compounds on apoptosis of human neutrophils and eosinophils. *J Exp Biomed Sci.* 2010. 16: 123-126.