

The Induction of ROS-dependent Autophagy by Particulate Matter 2.5 and Hydrogen Peroxide in Human Lung Epithelial A549 Cells

Beom Su Park^{1,2}, Da Hye Kim^{1,2}, Hyun Hwangbo^{1,3}, Hyesook Lee⁴, Su Hyun Hong^{1,3}, Jaehun Cheong² and Yung Hyun Choi^{1,3,5*}

¹Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

²Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea

³Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

⁴Department of Convergence Medicine, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 50612, Korea

⁵Core-Facility Center for Tissue Regeneration, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

Received January 24, 2022 / Revised February 22, 2022 / Accepted February 24, 2022

Recently, interest in the harmful factors of particulate matter (PM), a major component of air pollution, has been increasing. In particular, PM_{2.5} with a diameter of less than 2.5 μm is well known to induce oxidative stress accompanied by autophagy in human lung epithelial cells. However, studies on whether PM_{2.5} increases autophagy under oxidative stress and whether this process is reactive oxygen species (ROS)-dependent are insufficient. Therefore, in this study, we investigated whether PM_{2.5} promotes autophagy through the generation of ROS in human alveolar epithelial A549 cells. According to our results, cells co-treated with PM_{2.5} and hydrogen peroxide (H₂O₂) showed a lower cell viability than cells treated with each alone, which was associated with increased total and mitochondrial ROS production. The co-treatment of PM_{2.5} and H₂O₂ also increased autophagy induction, which was confirmed through Cyto-ID staining, and the expression of autophagy biomarker proteins increased. However, when ROS generation was artificially blocked by N-acetyl-L-cysteine pretreatment, the reduction in cell viability and induction of autophagy by PM_{2.5} and H₂O₂ co-treatment were markedly attenuated. Therefore, the present results suggest that PM_{2.5}-induced ROS generation may play a critical role in autophagy induction in A549 cells.

Key words : Autophagy, lung epithelial cells, particulate matter 2.5, ROS

서론

최근 인체 유해 인자로서 대기오염의 주성분인 미세먼지 (particulate matter, PM)에 관한 관심이 증대되고 있다[1, 16]. 이와 동시에 미세먼지가 호흡기 질환, 심혈관 질환, 피부 노화, 알레르기 질환의 악화, 폐암을 비롯한 기타 질병 유도의 원인이 된다는 증거가 축적되고 있다[1, 4, 18, 26]. 미세먼지 중에서 다양한 질병의 이환율과 관련된 환경 오염 정도를 나타내는 지표인 직경 2.5 μm 이하의 PM_{2.5}는 호흡기를 통해 폐로 들어가 폐포에 침착되어 폐에 악영향을 미치며, 혈액 순환을 통해 다양한 장기로의 침투가 가능하다[11, 22, 27].

과도한 reactive oxygen species (ROS)의 생성으로 정의되는 산화적 스트레스(oxidative stress)는 자가포식(autophagy)과 세포자멸사(apoptosis)를 포함한 세포 운명 결정 요인으로

작용하고, 세포 내로 침투된 미세먼지, 특히 PM_{2.5}는 미토콘드리아 손상에 따른 ROS 유발 요인으로 작용하며 염증성 반응이 동반된다[13, 14, 30]. 자가포식은 세포 내에서 제거되어야 할 손상된 세포 내 소기관과 단백질 등을 세포질에서 이중막 구성 요소(double-layered membrane)로 캡슐화(encapsulating)하여 자가포식 소체(autophagosome)를 형성하는 과정이며, 세포자멸사 유도 또는 억제에 관여한다[3, 24]. 비록 PM_{2.5}가 인간 폐 상피세포에서 산화적 스트레스를 유발하면서 자가포식을 유도한다는 사실은 보고된 바 있지만[2, 6, 15], 산화적 스트레스 상황에서 PM_{2.5}가 자가포식 유도를 증가시킬 수 있는지, 이 과정이 ROS 의존적인 현상인지에 관한 연구는 미진한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 폐 상피세포에서 PM_{2.5}가 ROS 생성의 증가를 통하여 자가포식의 유도를 촉진하는지를 조사하였다. 이를 위하여 인간 폐포 상피세포(alveolar epithelial cells)인 A549 세포를 사용하였으며, 산화적 스트레스의 모방을 위해서는 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)를 처리하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에 사용한 A549 세포는 American Type Culture

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-893-3333

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% heat-inactivated fetal bovine serum과 1% penicillin/streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지(WelGENE Inc., Gyeongsan, Korea)를 이용하여 5% CO₂ 및 37°C 조건에서 배양하였다. PM_{2.5}는 National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA)에서 제작된 표준 디젤 미세먼지 (SRM 1650b)로서 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich Chemical Co.)에 희석하여 50 mg/ml의 스톱 용액으로 제조하였다. Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입한 H₂O₂는 DMSO에 희석하여 100 mM로 스톱 용액을 제조하였다. PM_{2.5}와 H₂O₂를 세포에 처리하기 위해서는 RPMI 1640 배지에 적정 농도로 희석하였다.

세포 생존율 측정

A549 세포의 생존에 미치는 PM_{2.5}와 H₂O₂의 영향을 조사하기 위하여 세포를 6-well culture plate에 분주(1×10⁵ cells/well)한 후, 24시간 동안 안정시키고, 적정 농도의 PM_{2.5}와 H₂O₂를 단독 또는 동시에 처리하여 48시간 동안 배양하거나, PM_{2.5}와 H₂O₂를 처리하기 전에 10 mM의 N-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 1시간 전처리하였다. 처리가 완료된 세포에 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 형성된 formazan crystal을 DMSO에 용해시키고 enzyme-linked immunosorbent assay reader (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 처리되지 않은 대조군 세포에서 형성된 formazan crystal의 광학 밀도는 100% 생존율을 나타내는 데 사용되었고, 동일 조건에서 세포의 형태 변화를 위상차 현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

단백질 분리 및 Western blotting 분석

다양한 조건에서 배양된 세포들을 대상으로 자가포식 연관 단백질들의 발현을 조사하였다. 이를 위하여 수확된 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 수세 후 Bradford protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 총단백질을 추출하였으며, Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories)로 정량 후 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel을 이용하여 분리하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 PVDF membrane에 검출하고자 하는 단백질들에 해당되는 1차 항체(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 처리하여 4°C에서 2시간 이상 반응시킨 후, horseradish peroxidase 결합 2차 항체(Amersham Life Science,

Arlington Heights, IL, USA)를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후, enhanced chemiluminescence 용액(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)을 적용시킨 후, Fusion FX Imaging System (Vilber Lourmat, Torcy, France)을 사용하여 단백질의 발현 변화를 관찰하였다.

세포 내 ROS 생성 변화의 관찰

PM_{2.5}와 H₂O₂의 처리에 따른 A549 세포의 세포 내 총 ROS 생성 변화를 관찰하기 위해 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색법을 이용하였다. 이를 위하여 적정 농도의 PM_{2.5}와 H₂O₂를 단독 또는 동시에 처리하여 1시간 동안 배양하거나, PM_{2.5}와 H₂O₂를 처리하기 전에 10 mM의 NAC을 1시간 전처리하였다. 처리가 끝난 세포들을 PBS로 수세 후 10 μM의 DCF-DA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 37°C의 5% CO₂ incubator에서 20분간 반응시킨 후, 형광 현미경 (Carl Zeiss)을 이용하여 총 ROS 생성 정도를 평가하였다.

미토콘드리아 ROS 생성 변화의 관찰

미토콘드리아 ROS의 생성 정도를 관찰하기 위해서는 형광 probe인 MitoSOX를 사용하였다. 이를 위하여 상기와 동일 조건에서 배양된 세포를 PBS로 수세 후 5 μM의 MitoSOX 용액 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 처리하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. PBS로 세포를 다시 세척 후, 형광 현미경(Carl Zeiss) 하에서 ROS 생성 정도를 평가하였다.

자가포식 유도 관찰

PM_{2.5}와 H₂O₂의 처리에 따른 A549 세포의 자가포식 유도 정도를 관찰하기 위하여 PM_{2.5}와 H₂O₂를 단독 또는 동시에 처리하여 48시간 동안 배양하거나, 10 mM의 NAC을 1시간 처리 후, PM_{2.5}와 H₂O₂를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 처리가 끝난 세포를 대상으로 자가포식 유도의 정도를 관찰하기 위하여 Cyto-ID[®] assay kit (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA)를 사용하였으며, 자가포식의 이미지 분석을 위해 세포를 4% paraformaldehyde로 고정하고 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 핵을 염색한 후, 형광 현미경 하에서 관찰하였다.

통계 분석

실험 결과의 유의성을 판정하기 위하여 GraphPad Prism[®] version 5.0 (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA)의 one-way ANOVA를 사용하였으며, Tukey's test로 사후 검정하여 *p* < 0.05 값을 유의한 값으로 처리하였다.

결과 및 고찰

A549 세포의 증식에 미치는 PM_{2.5}와 H₂O₂의 영향

산화적 스트레스 조건에서 PM_{2.5}가 A549 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 PM_{2.5}와 H₂O₂의 단독 처리에 따른 세포 생존율의 변화를 먼저 조사하였다. 이를 위하여 다양한 농도의 PM_{2.5}와 H₂O₂가 단독 처리된 조건에서 48시간 동안 배양된 세포를 대상으로 MTT 분석을 수행하였다. Fig. 1A 및 Fig. B에 나타난 결과에 의하면, H₂O₂가 처리된 A549 세포의 생존율은 0.2 mM 처리군에서부터 유의적으로 감소되었으며, PM_{2.5} 처리군의 경우, 25 µg/ml 이상의 농도에서 세포 생존율이 유의적으로 억제되었고, A549 세포에서의 이러한 경향성은 선행 연구들의 결과와 매우 유사하다[7, 21]. 따라서 PM_{2.5}와 H₂O₂의 동시 처리에 따른 영향을 평가하기 위하여 H₂O₂는 약 84% 정도의 생존율을 보이는 0.25 mM을 선택하였으며, PM_{2.5}는 약 91% 및 83% 정도의 생존율을 보이는 25 µg/ml 및 50 µg/ml의 농도를 선정하였다. Fig. 1C의 결과에서 알 수 있듯이, 0.25 mM의 H₂O₂를 25 µg/ml 및 50 µg/ml의 PM_{2.5}과 동시에 처리하였을 경우, 각각의 세포 생존율은 약 75% 및 67% 정도나 나타나, 유의적으로 세포 생존율이 단독 처리군에 비하여 더욱 억제되었음을 알 수 있다. 아울러, PM_{2.5} 처리 농도의 증가에 따라 A549 세포에서 자가포식의 유도를 의미하는 공포(vacuole)의 형성이 증가되었고, H₂O₂와의 동시

처리군에서는 이러한 형태적 변화가 더욱 증가되었으며(Fig. 1D), 이는 자가포식이 유도되었을 가능성이 있음을 보여주는 결과이다.

A549 세포에서 ROS의 생성에 미치는 PM_{2.5}와 H₂O₂의 영향

몇몇 선행 연구에서 미세먼지는 A549 세포에서 산화적 스트레스를 통해 자가포식이 유도됨이 보고된 바 있다[6, 17, 23]. 따라서 PM_{2.5}가 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스를 더욱 증가시키는지를 조사하였으며, 이를 위하여 먼저 세포 내 총 ROS 생성의 정도를 먼저 조사하였다. DCF-DA의 염색을 이용한 결과에 의하면, H₂O₂ 뿐만 아니라 PM_{2.5}가 처리된 세포에서 ROS 생성의 증가를 의미하는 초록색 형광의 발현이 다소 증가되었으며, H₂O₂와 PM_{2.5}가 동시에 처리된 세포에서의 형광 강도는 더욱 증가하였다(Fig. 2A). 또한, 미토콘드리아 내 ROS의 생성을 의미하는 MitoSOX 염색에 의한 붉은색 형광의 강도 또한 이와 유사한 경향성을 보여주었다(Fig. 2B). 따라서 H₂O₂와 PM_{2.5}가 동시에 처리된 A549 세포에서 산화적 스트레스가 더욱 증가되었음을 알 수 있었으며, 이러한 현상은 ROS scavenger인 NAC의 존재 하에서는 모두 상쇄되었다.

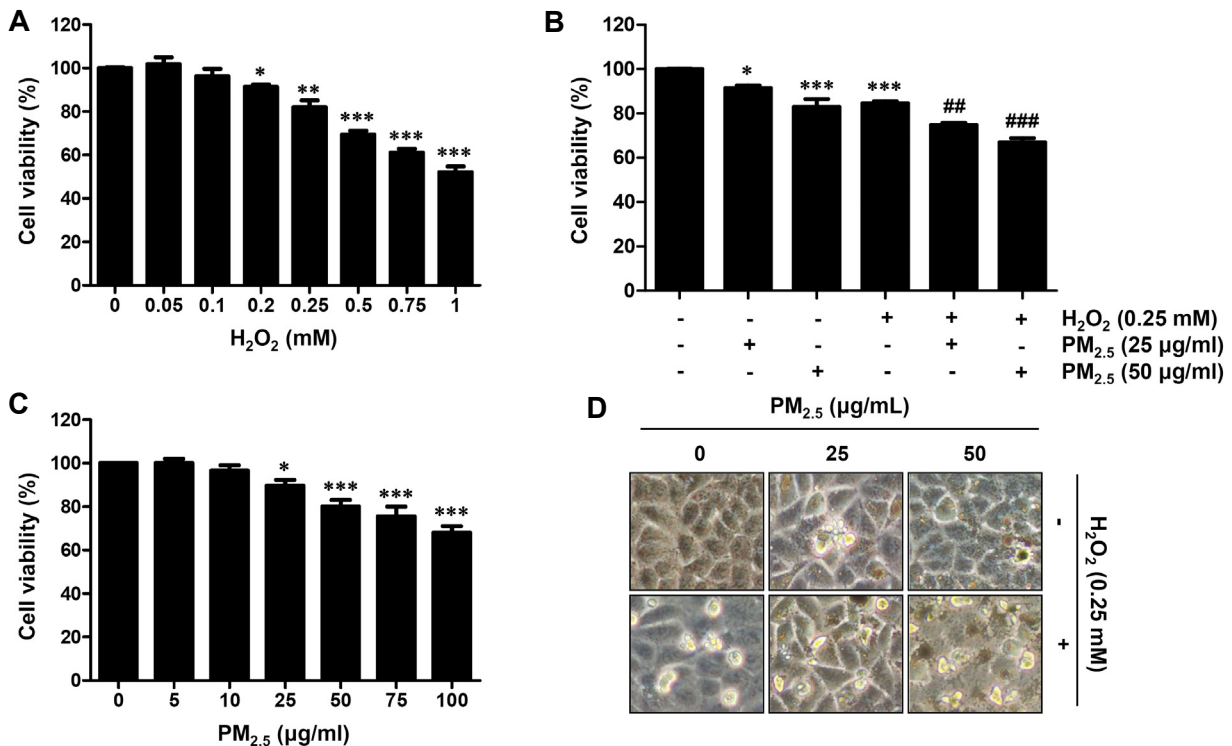


Fig. 1. Effects of PM_{2.5} and H₂O₂ on cell viability of A549 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of PM_{2.5} and/or H₂O₂ for 48 hr. (A-C) Cell viability was measured by the MTT assay. Data were presented as mean ± SD. All experiments were performed in triplicate (**p*<0.05, ***p*<0.01 and ****p*<0.001 vs untreated cells; ##*p*<0.01 and ###*p*<0.001 vs 25 µg/ml and 50 µg/ml PM_{2.5}-treated cells, respectively). (D) Cells were observed under an inverted phase contrast microscope (x200) and representative images were presented.

최근 Pardo et al. [20]은 A549 세포에서 PM_{2.5}에 의한 산화적 스트레스 유도에는 미토콘드리아에서 생성된 ROS가 주로 관여하며, PM_{2.5}에 함유된 polycyclic aromatic hydrocarbon 계열 물질들이 산화적 스트레스를 유발하는 주요 인자임을 보고한 바 있다. 또한, Fernando et al. [9]도 PM_{2.5}에 의한 미토콘드리아의 손상이 ROS 생성의 생성과 직접 관련성이 있음을 보고한 바 있으며, A549 세포에서의 이러한 결과들은 미토콘드리아의 기능 손상이 ROS의 생성과 직접적인 관련성이 있다는 다른 선행 연구들의 결과와 잘 일치된다[28, 31]. 아울러, A549 세포에서 H₂O₂ 처리에 의한 ROS 생성의 증가가 미토콘드리아 손상과도 직접적인 관련성이 있음이 밝혀진 바 있다 [19, 25]. 따라서 본 연구에서 나타난 PM_{2.5}와 H₂O₂의 동시 처리에 의한 ROS 생성의 증가는 예측 가능한 결과이며, 이는 아마도 미토콘드리아의 손상에 따른 전자전달계의 기능 이상과 관련성이 있을 것으로 추정되며 이에 관한 추가 연구가 요구된다.

A549 세포의 자가포식에 미치는 PM_{2.5}와 H₂O₂의 영향

H₂O₂와 PM_{2.5}에 의한 ROS의 생성이 A549 세포에서 자가포식 유도와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 H₂O₂와 PM_{2.5}가 단독 처리되었거나 동시 처리된 세포를 대상으로 자가포식 액포를 선택적으로 표지하는 Cyto-ID 염색을 수행하였다. Fig. 2C에 나타낸 바와 같이, H₂O₂ 또는 PM_{2.5}가 단독 처리된 A549 세포에서 자가포식이 유도되었음을 의미하는 초록 형광의 강도가 대조군에 비하여 다소 증가되었으며, H₂O₂와 PM_{2.5}가 동시 처리된 세포에서는 단독 처리군들에 비하여 더욱 높게 나타났다. 이는 H₂O₂와 PM_{2.5} 처리에 의한 자가포식의 유도가 동시 처리에 의하여 증가하였음을 의미하며, Fig. 1D의 결과를 잘 반영한다. 그러나 NAC의 전처리로 ROS의 생성을 인위적으로 차단한 경우, 자가포식 유도가 다소 감소되어 ROS의 생성이 자가포식 유도에 관여하고 있음을 알 수 있다.

한편, 자가포식의 개시 또는 자가포식 소체 형성 동안 beclin 1은 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) II로 전환되는 LC3 I에 결합하고 유비퀴틴 결합 단백질(ubi-

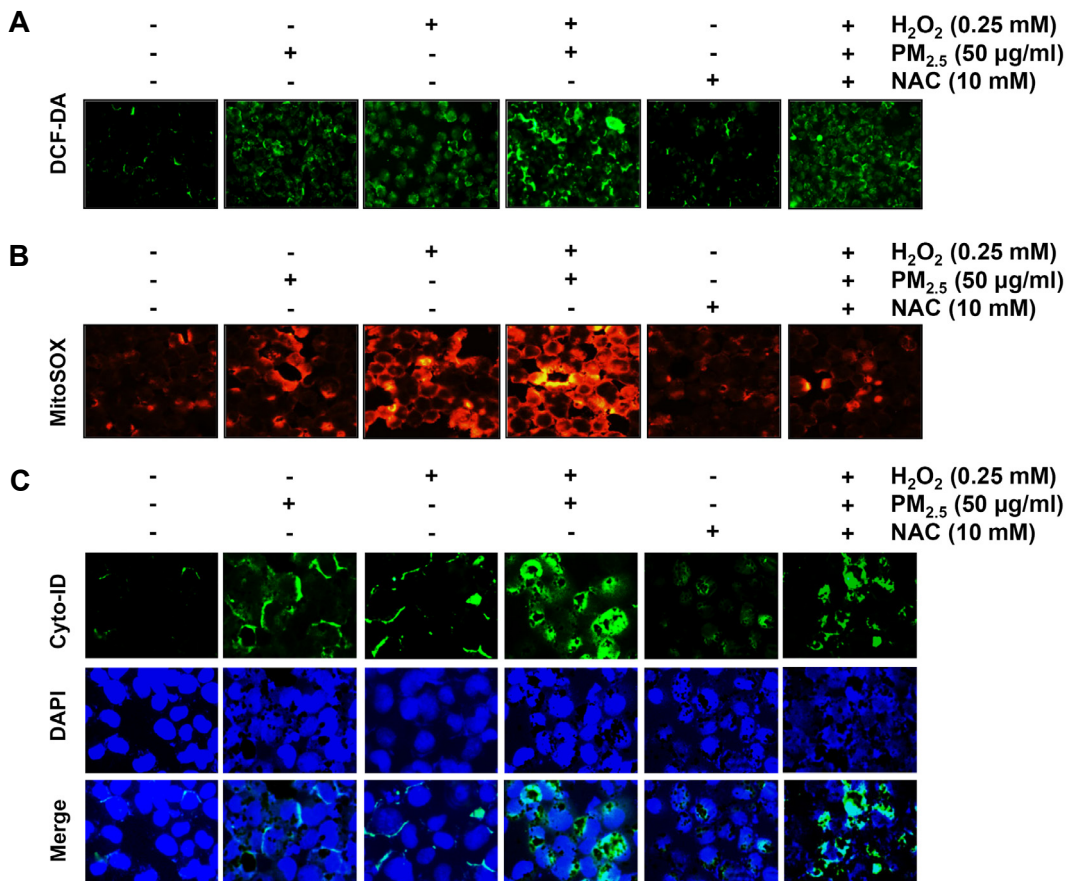


Fig. 2. Generation of ROS and induction of autophagy by PM_{2.5} and H₂O₂ in A549 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of PM_{2.5} and/or H₂O₂ for 1 hr (A and B) or 48 hr (C). (A and B) Representative fluorescence images of cells stained with DCF-DA (A) and MitoSOX (B) visualized by a fluorescence microscope. (C) Representative fluorescence images of cells showing autophagic vesicles stained with Cyto-ID green visualized by a fluorescence microscope. DAPI was used to counterstain the nuclei (blue).

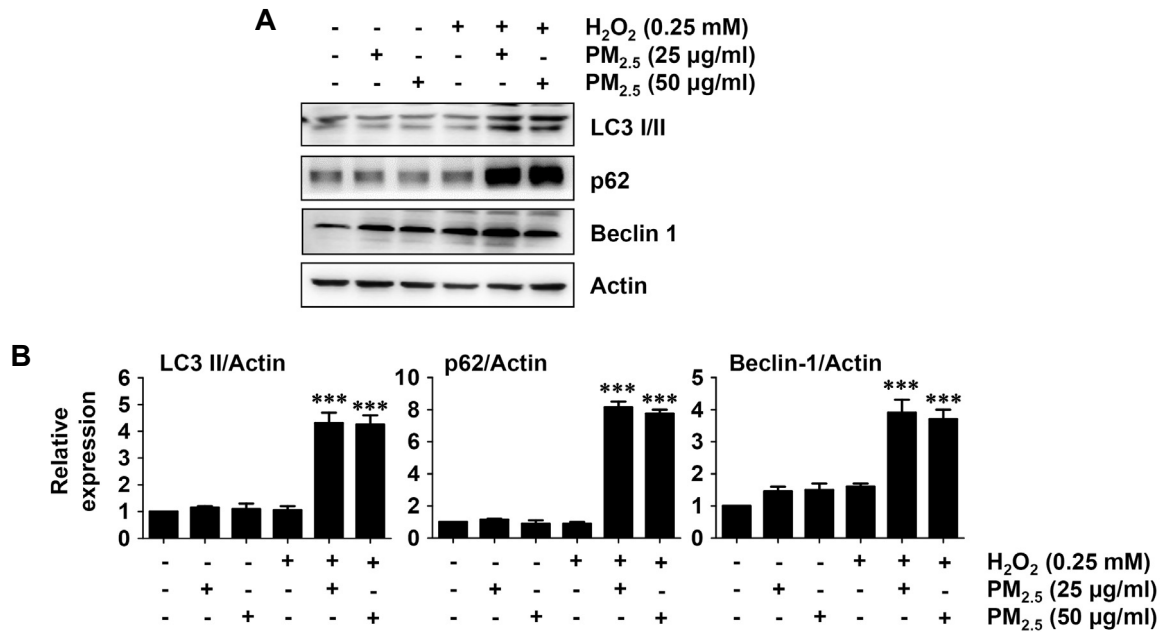


Fig. 3. Effects of PM_{2.5} and H₂O₂ on the expression of autophagy-regulatory proteins in A549 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of PM_{2.5} and/or H₂O₂ for 48 hr. (A) Total proteins were isolated from cells and Western blot analysis was performed using the indicated antibodies. Actin was used as a loading control. (B) Density quantification was performed and the relative expression ratio for actin was calculated. Data were presented as mean ± SD (^{***}*p*<0.001 vs 25 µg/ml and 50 µg/ml PM_{2.5}-treated cells).

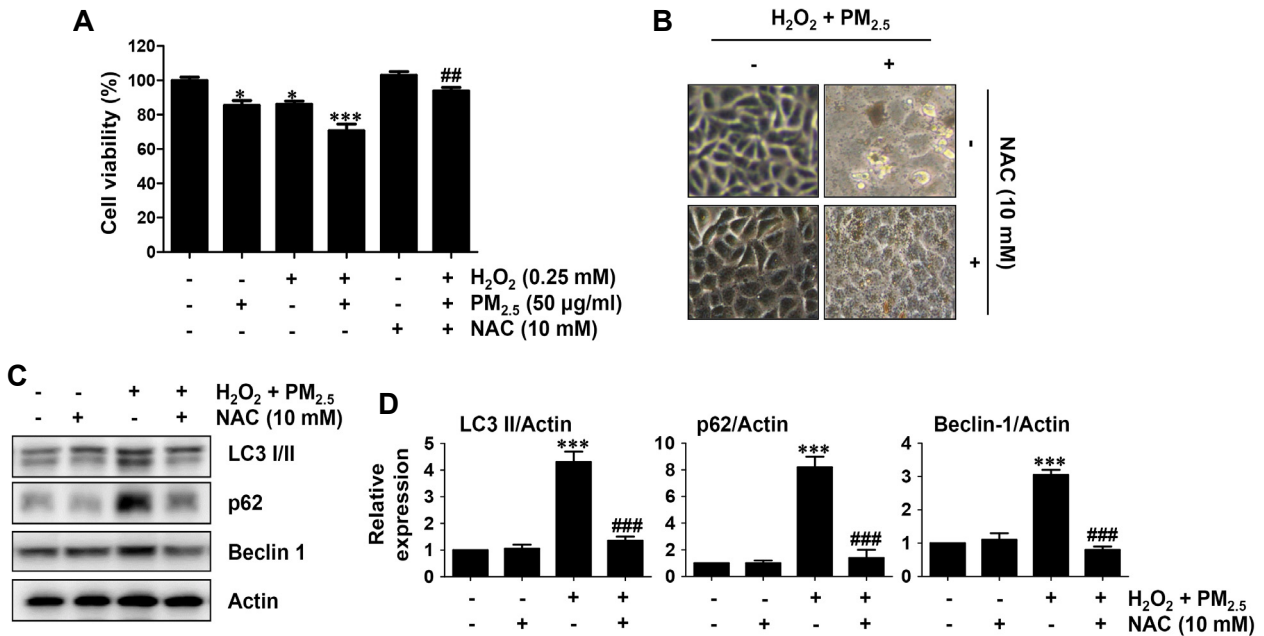


Fig. 4. Effects of ROS on the inhibition of cell viability and induction of autophagy by PM_{2.5} and H₂O₂ in A549 cells. Cells were cultured in media containing PM_{2.5} and H₂O₂ for 48 hr, or pre-treated with 10 mM NAC for 1 hr, followed by exposure to PM_{2.5} and H₂O₂ for an additional 48 hr. (A) Cell viability was measured by the MTT assay. (B) Cells were observed under an inverted phase contrast microscope (x200) and representative images were presented. (C) Total proteins were isolated from cells and Western blot analysis was performed using the indicated antibodies. Actin was used as a loading control. (D) Density quantification was performed and the relative expression ratio for actin was calculated. (A and D) Data were presented as mean ± SD (^{*}*p*<0.05 and ^{***}*p*<0.001 vs untreated cells; ^{##}*p*<0.01 and ^{###}*p*<0.001 vs PM_{2.5} and H₂O₂-treated cells).

quitin-binding protein)인 p62와 상호작용하기 때문에 이들 단백질은 자가포식 수준을 모니터링하기 위한 바이오 마커로 사용된다[10, 12, 29]. 따라서 이들의 발현 변화를 조사한 결과, p62의 발현은 H₂O₂와 PM_{2.5}의 단독 처리된 A549 세포에서 큰 변화가 없거나 다소 감소된 반면, LC3 II 및 beclin 1의 발현은 각각의 단독 처리군에서 대조군에 비하여 다소 증가되었다(Fig. 3). 그러나 H₂O₂와 PM_{2.5}가 동시에 처리된 세포에서는 3가지 단백질의 발현이 모두 현저히 증가하였다. 이러한 결과는 H₂O₂와 PM_{2.5}의 동시 처리가 자가포식 유도를 증가시켰다는 Fig. 2C의 결과를 잘 뒷받침하여 주는 것이다.

A549 세포에서 PM_{2.5}와 H₂O₂에 의한 세포독성 및 자가포식 유도에서 ROS의 영향

다음은 이상에서 관찰된 H₂O₂와 PM_{2.5}의 동시 처리에 따른 A549 세포에서의 세포독성 및 자가포식 유도의 증가 현상이 ROS의 생성과 직접 연관성이 있는지를 조사하였다. MTT 분석의 결과에 의하면, H₂O₂와 PM_{2.5}의 동시 처리에 의한 세포 생존율의 억제에는 NAC이 존재하는 조건에서 유의적으로 억제되었으며(Fig. 4A), 세포 내 공포의 형성 또한 감소되었다(Fig. 4B). 그리고 자가포식 바이오 마커인 3가지 단백질의 발현을 조사한 결과, H₂O₂와 PM_{2.5}의 동시에 처리된 A549 세포에서 매우 증가한 LC3 II, p62 및 beclin 1의 발현이 NAC이 전처리된 조건에서는 대조군 수준으로 유지되었다(Fig. 4C 및 Fig. D). 이는 H₂O₂와 PM_{2.5}의 단독 처리군에 비하여 동시 처리에 의한 세포독성의 증가 및 자가포식 유도가 ROS 생성과 직접적인 연관성이 있음을 의미한다.

이상의 결과는 PM_{2.5}에 의한 산화적 스트레스의 증가가 A549 세포에서 자가포식에서 핵심적인 역할을 할 가능성이 있음을 시사하며, 이는 Deng et al. [7]이 제시한 PM_{2.5}에 의한 폐 기능 손상이 ROS 의존적일 가능성이란 결과를 잘 뒷받침하여 준다. 아울러 고농도의 PM_{2.5} 처리에 의한 A549 세포의 세포자멸사 유도에도 ROS 의존적 자가포식이 관여하며, 이 과정에서 동반되는 염증성 cytokine의 발현도 ROS의 생성을 차단하였을 경우 억제되었음이 보고된 바 있다[8]. 또한, PM_{2.5}의 노출은 ROS 수준과 자가포식의 현저한 증가를 통하여 폐 종양 세포의 이동과 침습 및 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition)를 증가시켜 폐암 세포의 악성화를 촉진할 수 있음이 밝혀졌으며[6], 이러한 현상은 PM₁₀에 의해서도 유사하게 보고되었다[5].

본 연구에서는 산화적 스트레스 상황에서 PM_{2.5}가 ROS의 생성을 더욱 증가시키며, 이는 자가포식 유도의 촉진과 연관성이 있음을 제시하였다. 비록, 이 과정에서 미토콘드리아 ROS의 생성이 핵심 요인으로 작용하였을 것으로 추정되지만, 미토콘드리아 기능 손상 및 세포자멸사와 연관된 추가 연구가 요구되며, ROS의 생성에 기인하는 다른 신호 내 인자들의 역할 또한 규명되어야 할 것이다. 특히 이러한 자가포식 촉진

현상이 세포자멸사의 촉진 요인으로 작용하는지 또는 그 반대의 역할을 하는지에 관한 규명이 요구된다. 아울러 세포 내 신호 전달계의 역할과 연관된 세포 내 소기관의 관여 여부와 최근 증가되고 있는 산화적 스트레스 상황에서 염증성 반응에 대한 미세먼지의 역할도 추가로 밝혀져야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단에서 시행한 기초연구사업 지원(No. 2021R1A2C2009549)에 의해 수행되었습니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Almetwally, A. A., Bin-Jumah, M. and Allam, A. A. 2020. Ambient air pollution and its influence on human health and welfare: An overview. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **27**, 24815-24830.
2. Badran, G., Verdin, A., Grare, C., Abbas, I., Achour, D., Ledoux, F., Roumie, M., Cazier, F., Courcot, D., Lo Guidice, J. M. and Garçon, G. 2020. Toxicological appraisal of the chemical fractions of ambient fine (PM_{2.5-0.3}) and quasi-ultra-fine (PM_{0.3}) particles in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Environ. Pollut.* **263**, 114620.
3. Cao, W., Li, J., Yang, K. and Cao, D. 2021. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull. Cancer* **108**, 304-322.
4. Combes, A. and Franchineau, G. 2019. Fine particle environmental pollution and cardiovascular diseases. *Metabolism* **100S**, 153944.
5. de Oliveira Alves, N., Vessoni, A. T., Quinet, A., Fortunato, R. S., Kajitani, G. S., Peixoto, M. S., Hacon, S. S., Artaxo, P., Saldiva, P., Menck, C. F. M. and Batistuzzo de Medeiros, S. R. 2017. Biomass burning in the Amazon region causes DNA damage and cell death in human lung cells. *Sci. Rep.* **7**, 10937.
6. Deng, X., Feng, N., Zheng, M., Ye, X., Lin, H., Yu, X., Gan, Z., Fang, Z., Zhang, H., Gao, M., Zheng, Z. J., Yu, H., Ding, W. and Qian, B. 2017. PM_{2.5} exposure-induced autophagy is mediated by lncRNA loc146880 which also promotes the migration and invasion of lung cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1861**, 112-125.
7. Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D. and Ding, W. 2013. PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol. In Vitro* **27**, 1762-1770.
8. Deng, X., Zhang, F., Wang, L., Rui, W., Long, F., Zhao, Y.,

- Chen, D. and Ding, W. 2014. Airborne fine particulate matter induces multiple cell death pathways in human lung epithelial cells. *Apoptosis* **19**, 1099-1112.
9. Fernando, I. P. S., Jayawardena, T. U., Kim, H. S., Lee, W. W., Vaas, A. P. J. P., De Silva, H. I. C., Abayaweera, G. S., Nanayakkara, C. M., Abeytunga, D. T. U., Lee, D. S. and Jeon, Y. J. 2019. Beijing urban particulate matter-induced injury and inflammation in human lung epithelial cells and the protective effects of fucosterol from *Sargassum binderi* (Sonder ex J. Agardh). *Environ. Res.* **172**, 150-158.
 10. Hensley, K. and Harris-White, M. E. 2015. Redox regulation of autophagy in healthy brain and neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **84**, 50-59.
 11. Jeong, S., Park, S. A., Park, I., Kim, P., Cho, N. H., Hyun, J. W. and Hyun, Y. M. 2019. PM_{2.5} exposure in the respiratory system induces distinct inflammatory signaling in the lung and the liver of mice. *J. Immunol. Res.* **2019**, 3486841.
 12. Kirkin, V. 2020. History of the selective autophagy research: How did it begin and where does it stand today? *J. Mol. Biol.* **432**, 3-27.
 13. Lee, H., Kim, D. H., Kim, J. H., Park, S. K., Jeong, J. W., Kim, M. Y., Hong, S. H., Song, K. S., Kim, G. Y., Hyun, J. W. and Choi, Y. H. 2021. Urban aerosol particulate matter promotes necrosis and autophagy *via* reactive oxygen species-mediated cellular disorders that are accompanied by cell cycle arrest in retinal pigment epithelial cells. *Antioxidants (Basel)* **10**, 149.
 14. Liang, P., Xing, X., Wu, J., Song, J. and Liu, Q. 2020. PM_{2.5} promotes apoptosis of human epidermal melanocytes through promoting oxidative damage and autophagy. *Gen. Physiol. Biophys.* **39**, 569-577.
 15. Liu, T., Wu, B., Wang, Y., He, H., Lin, Z., Tan, J., Yang, L., Kamp, D. W., Zhou, X., Tang, J., Huang, H., Zhang, L., Bin, L. and Liu, G. 2015. Particulate matter 2.5 induces autophagy *via* inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin kinase signaling pathway in human bronchial epithelial cells. *Mol. Med. Rep.* **12**, 1914-1922.
 16. Loxham, M. and Nieuwenhuijsen, M. J. 2019. Health effects of particulate matter air pollution in underground railway systems - A critical review of the evidence. *Part. Fibre Toxicol.* **16**, 12.
 17. Lukaszewicz, A., Cwiklinska, M., Zarzecki, M., Szoka, P., Lachowicz, J. and Holownia, A. 2019. Cytotoxicity, oxidative stress, and autophagy in human alveolar epithelial cell line (A549 cells) exposed to standardized urban dust. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1176**, 101-108.
 18. Lynch, H. N., Loftus, C. T., Cohen, J. M., Kerper, L. E., Kennedy, E. M. and Goodman, J. E. 2016. Weight-of-evidence evaluation of associations between particulate matter exposure and biomarkers of lung cancer. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **82**, 53-93.
 19. Olson, K. R., Gao, Y., Steiger, A. K., Pluth, M. D., Tessier, C. R., Markel, T. A., Boone, D., Stahelin, R. V., Batinic-Haberle, I. and Straubg, K. D. 2020. Effects of manganese porphyrins on cellular sulfur metabolism. *Molecules* **25**, 980.
 20. Pardo, M., Xu, F., Shemesh, M., Qiu, X., Barak, Y., Zhu, T. and Rudich, Y. 2019. Nrf2 protects against diverse PM_{2.5} components-induced mitochondrial oxidative damage in lung cells. *Sci. Total Environ.* **669**, 303-313.
 21. Peng, X., Wu, G., Zhao, A., Huang, K., Chai, L., Natarajan, B., Yang, S., Chen, H. and Lin, C. 2020. Synthesis of novel caffeic acid derivatives and their protective effect against hydrogen peroxide induced oxidative stress *via* Nrf2 pathway. *Life Sci.* **247**, 117439.
 22. Qibin, L., Yacan, L., Minli, J., Meixi, Z., Chengye, L., Yuping, L. and Chang, C. 2020. The impact of PM_{2.5} on lung function in adults with asthma. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **24**, 570-576.
 23. Shumin, Z., Luying, Z., Senlin, L., Jiaxian, P., Yang, L., Lanfang, R., Tingting, X., Wei, Z., Shuijun, L., Weqian, W. and Qingyue, W. 2021. Ambient particulate matter-associated autophagy alleviates pulmonary inflammation induced by *Platanus* pollen protein 3 (Pla3). *Sci. Total Environ.* **758**, 143696.
 24. Thorburn, A. 2020. Crosstalk between autophagy and apoptosis: Mechanisms and therapeutic implications. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **172**, 55-65.
 25. Wang, M., Cao, X., Luan, C. and Li, Z. 2019. Hydrogen sulfide attenuates hydrogen peroxide-induced injury in human lung epithelial A549 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3975.
 26. Wu, J. Z., Ge, D. D., Zhou, L. F., Hou, L. Y., Zhou, Y. and Li, Q. Y. 2018. Effects of particulate matter on allergic respiratory diseases. *Chronic Dis. Transl. Med.* **4**, 95-102.
 27. Xing, Y. F., Xu, Y. H., Shi, M. H. and Lian, Y. X. 2016. The impact of PM_{2.5} on the human respiratory system. *J. Thorac. Dis.* **8**, E69-E74.
 28. Yang, J., Huo, T., Zhang, X., Ma, J., Wang, Y., Dong, F. and Deng, J. 2018. Oxidative stress and cell cycle arrest induced by short-term exposure to dustfall PM_{2.5} in A549 cells. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **25**, 22408-22419.
 29. Yoshii, S. R. and Mizushima, N. 2017. Monitoring and measuring autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1865.
 30. Zhu, X. M., Wang, Q., Xing, W. W., Long, M. H., Fu, W. L., Xia, W. R., Jin, C., Guo, N., Xu, D. Q. and Xu, D. G. 2018. PM_{2.5} induces autophagy-mediated cell death *via* NOS2 signaling in human bronchial epithelium cells. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 557-564.
 31. Zou, Y., Jin, C., Su, Y., Li, J. and Zhu, B. 2016. Water soluble and insoluble components of urban PM_{2.5} and their cytotoxic effects on epithelial cells (A549) *in vitro*. *Environ. Pollut.* **212**, 627-635.

초록 : 미세먼지와 산화적 스트레스에 의한 인간 폐 상피 A549 세포에의 ROS 의존적 자가포식 유도

박범수^{1,2} · 김다혜^{1,2} · 황보현^{1,3} · 이혜숙⁴ · 홍수현^{1,3} · 정재훈² · 최영현^{1,3,5*}

(¹동의대학교 항노화연구소, ²부산대학교 분자생물학과, ³동의대학교 한의과대학 항노화연구소, ⁴부산대학교 의과대학 융합의학교실, ⁵동의대학교 생체조직재생핵심연구지원센터)

최근 인체에 유해한 요인으로 대기오염의 주성분인 미세먼지에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히 직경이 2.5 μm 미만인 PM_{2.5}는 인간의 폐 상피세포에서 자가포식을 동반한 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있다. 그러나 PM_{2.5}가 산화적 스트레스 하에서 자가포식을 증가시키는지와 이 과정이 ROS 의존적인지에 대한 연구는 충분하지 않은 실정이다. 본 연구에서는 PM_{2.5}가 인간 폐 상피 A549 세포에서 ROS 생성을 통해 자가포식을 촉진하는지를 조사하였다. 우리의 결과에 의하면, PM_{2.5}와 H₂O₂를 함께 처리한 세포에서는 각각이 단독 처리된 세포에 비하여 세포 생존력이 유의적으로 감소하였으며, 이는 전체 및 미토콘드리아 ROS 생성의 증가와 관련이 있었다. 또한, PM_{2.5}와 H₂O₂의 동시 처리는 Cyto-ID 염색을 통해 확인된 바와 같이 자가포식 유도의 증가와 LC3, p62 및 beclin 1과 같은 자가포식 바이오 마커 단백질의 발현을 증가시켰다. 그러나 NAC의 전처리에 의하여 ROS의 생성을 인위적으로 차단하였을 경우, PM_{2.5}와 H₂O₂의 동시 처리에 의한 세포 생존율의 감소와 자가포식 유도는 현저하게 억제되었다. 따라서, PM_{2.5}에 의해 유도된 ROS 생성이 A549 세포에서 자가포식 유도에 중요한 역할을 할 것으로 추측되며, 이는 PM_{2.5}에 의해 유도될 수 있는 폐 기능 손상이 산화적 스트레스 하에서 더욱 증가할 수 있음을 의미한다.